Efeitos da terapia de reposição com doses fisiológicas de testosterona sobre a reatividade vascular coronariana em ratos espontaneamente hipertensos orquiectomizados

Juan Carlos Arapa Diaz

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Vitória, Julho de 2019

JUAN CARLOS ARAPA DIAZ

Efeitos da terapia de reposição com doses fisiológicas de testosterona sobre a reatividade vascular coronariana em ratos espontaneamente hipertensos orquiectomizados

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Roger Lyrio dos Santos

Universidade Federal do Espírito Santo
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Vitória, Julho de 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

REGISTRO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO CANDIDATO AO GRAU DE MESTRE PELO PPGCF/CCS/UFES

Nº. Matrícula do Candidato: 2017132790

A Comissão Julgadora que examinou a Dissertação de Mestrado, intitulada "Efeitos da terapia de reposição com doses fisiológicas de testosterona sobre a reatividade vascular coronariana em ratos espontaneamente hipertensos orquiectomizados", apresentada e defendida publicamente pelo aluno Juan Carlos Arapa Diaz, no dia 26 de julho de 2019, às 9:00 horas, decidiu, por unanimidade, aprovar a referida Dissertação de Mestrado e, portanto, declara que o aluno faz jus à obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas

Vitória, 26 de Julho de 2019.

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Roger Lyrio dos Santos – Orientador
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES

Prof. Dr. Leonardo dos Santos – Membro interno
Universidade Federal do Espírito Santo – UFES

Profª. Drª. Agata Lages Gava – Membro externo
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

Diaz, Juan Carlos Arapa, 1981-
D542e Efeitos da terapia de reposição com doses fisiológicas de testosterona sobre a reatividade vascular coronariana em ratos espontaneamente hipertensos orquiectomizados / Juan Carlos Arapa Diaz. - 2019.
86 f. : il.

Orientador: Roger Lyrio dos Santos.
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Sistema cardiovascular - Doenças. 2. Hipertensão. 3. Artérias coronárias. 4. Testosterona. 5. Endotélio. I. dos Santos, Roger Lyrio. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 612

AGRADECIMENTOS

A minha Família, especialmente a meu pai Francisco Arapa Sillo, a minha mãe Mery Diaz de Arapa, a meus irmãos Elvis e Norma. Obrigado por fazer parte da minha vida e por serem minha base, me permitindo correr atrás dos meus sonhos e chegar até aqui.

Aos amigos do Laboratório de Reatividade Vascular Coronariana-UFES-Brasil, por me receberem tão bem e me ajudarem em tudo, por todo o ensinamento pessoal e profissional.

Ao meu orientador o professor Dr. Roger Lyrio dos Santos, pela oportunidade, pelo acolhimento e por ter depositado sua confiança em mim. Por todo o ensinamento e a ajuda na escrita da dissertação e do artigo, muito obrigado.

Agradeço a Nathalie Tristão Banhos Delgado de Lima e a Wender do Nascimento Rouver pela ajuda na escrita e discussão do presente trabalho, muito obrigado.

A Marcela Daruge Grando do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil; por ter apoiado com as análises de *western blotting* deste trabalho.

A Eduardo Damasceno Costa do Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil; por ter apoiado com as análises de fluorescência deste trabalho.

A UFES, CAPES, pelo apoio financeiro e por todas as oportunidades acadêmicas que as mesmas proporcionaram.

Ao meu mestre, Dr. Azael Paz Aliaga, por ter me ensinado a seguir o caminho da pesquisa científica.

A minha Escola de Medicina da Universidade Nacional de San Agustín, Arequipa-Peru, por minha formação acadêmica e por iniciar-me na pesquisa científica e chegar até aqui.

"Eu ainda não morri ... meus amigos; agora é missão de vocês terminar o trabalho iniciado, seguindo o caminho que descrevi ..."

(Daniel Alcides Carrión García, Mártir da medicina peruana)

RESUMO

Acredita-se que a redução de testosterona (T) em homens favoreça o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, atribuindo à T um provável papel protetor ao nível cardiovascular. Diante desse contexto, o nosso estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da terapia de reposição com doses fisiológicas de T sobre a reatividade vascular coronariana. Todos os procedimentos foram aprovados sob o No. 062/2017 – CEUA/UFES. Foram utilizados ratos machos hipertensos adultos da linhagem SHR (*Spontaneously Hypertensive Rat*) apresentando 10 semanas de idade. Os animais foram orquiectomizados com 8 semanas de idade (grupo ORX) e imediatamente iniciado o tratamento com testosterona (0,5 mg/Kg, *s.c.*) por 15 dias (grupo ORX + T) ou inibidor de aromatase (0.1 mg/kg/dia via gavagem – grupo ORX + T + AI), os animais SHAM passaram pelo mesmo procedimento cirúrgico, no entanto, sem a remoção das gônadas. A pressão arterial sistólica (PAS) foi mensurada por pletismografia de cauda. Parâmetros ponderais foram coletados. A reatividade vascular coronariana foi avaliada de acordo com o método de Langendorff e curvas de bradicinina (10^{-10} a 10^{-6} M) antes e após inibidores da óxido nítrico sintase (N^{ω}-nitro-L-arginina metil-éster - L-NAME 100 μM) e da ciclooxigenase (indometacina - INDO 2,8 μM) isolados ou combinados com inibidor da CYP (clotrimazol – CLOT 0,75 μM) ou com bloqueador do canal para potássio (tetrabutilamônio - TBA 0,75 mM) foram realizada. A intensidade da expressão das proteínas eNOS, COX-1, COX-2, gp91phox e Akt foram quantificadas pelo método de *Western blotting*. O protocolo de marcação para a síntese de NO, ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em artérias coronárias foi por espectrofluorimetria. O peso relativo da próstata e da vesícula seminal diminuiu, contudo o das adrenais e da pituitária aumentou pela orquiectomia e foram revertidos parcial ou totalmente pela T. A PAS diminuiu no grupo ORX, porém foi mantida no grupo ORX + T. A pressão de perfusão coronariana basal não foi alterada entre os grupos estudados e o NO e a PGI_2 participaram da modulação da pressão coronariana nos grupos SHAM, ORX e ORX +T. O relaxamento à BK não foi alterado no grupo ORX e aumentou nos grupos ORX + T e ORX + T + AI, sem diferença entre estes últimos. O NO, PGI_2 e a hiperpolarização dependente do endotélio (EDH) participaram do relaxamento à BK nos grupos SHAM e ORX, e somente NO e EDH (sendo que este último apresentou maior participação) no grupo ORX + T. A expressão da eNOS, COX-1, COX-2 e gp91phox não foi alterada pela

orquiectomia nem pela T, porém a expressão da Akt aumentou no grupo ORX mas não foi restaurada no grupo ORX + T. A síntese de NO não foi alterada nos grupos, por outro lado os níveis de $O_2^{\bullet -}$ e H_2O_2 aumentaram no grupo ORX +T. Em conclusão, nosso principal achado é que a terapia de reposição com doses fisiológicas de testosterona melhora o relaxamento à BK, independente da aromatização, no leito vascular coronariano de SHR orquiectomizado, com aumento da EDH [ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) estimulando canais para potássio e a provável participação do H_2O_2]. A caracterização desses mecanismos poderia levar a uma melhor compreensão dos efeitos do tratamento com testosterona no leito vascular coronariano, além de contribuir para desenvolvimento de melhores formas de terapia para o tratamento do hipogonadismo e das doenças cardiovasculares.

Palavras-chave: Leito vascular coronariano, testosterona, orquiectomia, terapia de reposição hormonal, hiperpolarização dependente do endotélio.

ABSTRACT

It is believed that the decrease of testosterone (T) in men favors the development of cardiovascular diseases, attributing to T a possible protective role for the cardiovascular system. In view of this context, our study aimed to evaluate the effects of T-replacement therapy on coronary vascular reactivity. All procedures were approved under No. 062/2017 – CEUA/UFES. Adult hypertensive male rats SHR (Spontaneously Hypertensive Rat) at 10 weeks of age were used. The animals were orchiectomized at 8 weeks (ORX group) and immediately started treatment with testosterone (0.5 mg / kg, sc) for 15 days (ORX + T group) or aromatase inhibitor (0.1 mg/kg/day via gavage - ORX + T + AI group), the SHAM animals underwent the same surgical procedure, however, without the removal of the gonads. Systolic blood pressure (SBP) was measured by tail plethysmography. Weight parameters were collected. Coronary vascular reactivity was conducted according to the Langendorff method and bradykinin curves (10^{-10} to 10^{-6} M) before and after inhibitors of nitric oxide synthase (N^{ω}-Nitro-L-arginine methyl-éster - L-NAME 100 μM) and cyclooxygenase (Indomethacin - INDO 2.8 μM) isolated or combined with CYP inhibitor (clotrimazole - CLOT 0.75 μM) or combined with potassium channel blocker (Tetrabutylammonium - TBA, 0.75 mM) were performed. The expression intensity of the eNOS, COX-1, COX-2, gp91phox and Akt proteins were quantified by the Western blotting method. The labeling protocol for the synthesis of NO, superoxide anion ($O_2^{\bullet -}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) in coronary arteries was by spectrofluorimetry. The relative weight of the prostate and seminal vesicle decreased, however, those of the adrenal and pituitary increased by orchiectomy and were partially or totally reversed by T. SBP was lower in ORX group, with not changes in ORX + T group. The baseline coronary perfusion pressure was not altered in all studied groups, and NO and PGI_2 participated in the modulation of coronary pressure in SHAM, ORX and ORX + T groups. The BK relaxation was not altered in the ORX group, and increased in the ORX + T and ORX + T + AI groups, with no difference between the latter groups. The NO, PGI_2 and EDH participated in relaxation to BK in the SHAM and ORX groups, and only NO and EDH (which was greater) in the ORX + T group. The expression of eNOS, COX-1, COX-2, and gp91phox was not altered by orchiectomy or T, but the expression of Akt increased in the ORX group and was not restored in the ORX + T group. The synthesis of NO was not altered in all studied groups, on the other hand, the levels of $O_2^{\bullet -}$ and H_2O_2

increased in the ORX + T group. In conclusion, our main finding is that replacement therapy with a physiological dose of testosterone improves relaxation to BK independently of the aromatization in the coronary vascular bed from orchiectomized SHR, with an increase in EDH [epoxy-eicosatrienoic acids (EETs) stimulating potassium channels and the likely participation of H_2O_2]. The characterization of these mechanisms could lead to a better understanding of the effects of treatment with testosterone in the coronary vascular bed, in addition to contributing to the development of improved therapeutic strategies for the treatment of hypogonadism and cardiovascular diseases.

Key words: Coronary vascular bed, testosterone, orchiectomy, testosterone replacement therapy, endothelium-dependent hyperpolarization.

SUMÁRIO

1. **INTRODUÇÃO** 17

2. **OBJETIVOS** 26

2.1. GERAL 26

2.2. ESPECÍFICOS 26

3. **MATERIAL E MÉTODOS** 28

3.1. ANIMAIS 28

3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS 28

3.3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS 29

3.3.1. Orquiectomia 29

3.3.2. Terapia de reposição com testosterona 30

3.3.3. Avaliação não invasiva da pressão arterial 30

3.3.4. Dados ponderais 30

3.3.5. Método de estudo de coração isolado 31

3.3.6. Dissecção das artérias coronárias 35

3.3.7. Western blotting 36

3.3.8. Produção de óxido nítrico (NO), ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em artérias coronárias 37

3.3.9. Análise estatística 38

4. **RESULTADOS** 39

4.1. Dados ponderais 39

4.2. Pressão arterial sistólica 40

4.3. Pressão de perfusão coronariana basal 41

4.4. Papel dos $EDRF_s$ na manutenção da pressão de perfusão coronariana basal. 41

4.5. Reatividade do leito vascular coronariano em resposta à bradicinina 42

4.6. Mediadores endoteliais no relaxamento do leito vascular coronariano 43

4.7. Expressão proteica da eNOS, COX-1, COX-2, gp91phox e Akt em artérias coronárias 45

4.8. Produção de NO em artérias coronárias 47

4.9. Produção de $O_2^{\bullet -}$ em artérias coronárias 48

4.10. Produção de H_2O_2 em artérias coronárias 49

5. **DISCUSSÃO** 50

6. **CONCLUSÃO**.....59

7. **REFERÊNCIAS** 60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da parede arterial. 19

Figura 2. Progressão típica da aterosclerose coronariana.....20

Figura 3. Diagrama esquemático dos determinantes da oferta e demanda de oxigênio miocárdico.....21

Figura 4. Principais vias da esteroidogênese adrenal, ovariana e testicular. 23

Figura 5. Linha do tempo dos experimentos em SHR. 30

Figura 6. Sistema de Langendorff com fluxo constante. 33

Figura 7. Linha do tempo dos protocolos de reatividade vascular coronariana em coração isolado de SHR. 34

Figura 8: Pressão arterial sistólica (PAS) em SHR. SHAM (n = 13), ORX (n = 18), ORX + T (n = 22) e ORX + T + AI (n = 15). 41

Figura 9. Pressão de perfusão coronariana (PPC) basal nos grupos SHAM (n = 12), ORX (n = 10), ORX +T (n = 9) e ORX + T+ AI (n = 8). 42

Figura 10. A) Curvas dose-resposta à bradicinina (BK, 10^{-10} a 10^{-6} M) no leito vascular coronariano dos grupos SHAM (n = 12), ORX (n = 10), ORX + T (n = 9) e ORX + T + AI (n = 8). **B**) Área sob a curva (AUC, em unidades arbitrárias) após administração da BK em todos os grupos. 44

Figura 11. Curvas dose-resposta à bradicinina (BK,10^{-10} a 10^{-6} M) no leito vascular coronariano dos grupos SHAM (A), ORX (B) e ORX + T (C) antes e após perfusão com L-NAME 100 μM; Indometacina 2,8 μM (INDO); L-NAME + INDO; L-NAME + INDO + Clotrimazol 0,75 μM ou L-NAME + INDO + Tetrabutilamônio 0,75 mM 45

Figura 12. Participação dos fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs) no relaxamento induzido pela BK no leito vascular coronariano dos grupos SHAM (n = 7), ORX (n = 7) e ORX + T (n = 7). 46

Figura 13. *Western blotting* e análise densidométrica da expressão da eNOS, COX-1, COX-2, gp91phox e Akt nas artérias coronárias dos grupos SHAM, ORX e ORX + T. 47

Figura 14. Detecção espectrofluorométrica de oxido nítrico (NO) com DAF-2 em cortes transversais de artérias coronárias no estado basal, quando incubado com ACh ou ACh + L-NAME dos grupos SHAM, ORX e ORX + T. 48

Figura 15. Detecção espectrofluorométrica do ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) pelo DHE em cortes transversais de artérias coronárias no estado basal, quando incubado com ANG II ou ANG II +Tiron dos grupos SHAM, ORX e ORX + T. 49

Figura 16. Detecção espectrofluorométrica de peroxido de hidrogênio (H_2O_2) com DCF-DA em cortes transversais de artérias coronárias no estado basal, quando incubado com ANG II ou ANG II + Catalase dos grupos SHAM, ORX e ORX + T. 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peso corpóreo (g), comprimento da tíbia (mm) e peso relativo (mg/mm) da próstata, vesícula seminal, glândulas adrenais ou pituitária nos grupos SHAM, ORX e ORX + T após 15 dias de tratamento com doses fisiológicas de testosterona.....38

Tabela 2. Delta de variação percentual (%) da PPC nos grupos SHAM, ORX e ORX + T após a perfusão com 100 μM de L-NAME, 2,8 μM de indometacina (INDO), L-NAME + INDO, L-NAME + INDO + 0,75 μM de clotrimazol (CLOT) ou, L- NAME + INDO + 0,75 mM de Tetrabutilamônio (TBA). 41

SIGLAS E ABREVIATURAS

Δ (%)	Variação expressa em porcentagem
ACh	Acetilcolina
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AI	Inibidor da aromatase
ANG II	Angiotensina II
AUC	Área sob a curva
BK	Bradicinina
BSA	Albumina de soro bovino
cGMP	3’, 5’ Monofosfato de guanosina cíclico
CLOT	Clotrimazol
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
CYP	Citocromo P450
DAF-2	Diacetato de 4,5-diaminofluoresceína
DCF-DA	2’,7’ diclorodihidrofluoresceína-diacetato
DHE	Dihidroetídio
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHT	Di-hidrotestosterona
E_2	17β-Estradiol
EDCFs	Fatores de contração derivados do endotélio
EDH	Hiperpolarização dependente do endotélio
EDRFs	Fatores de relaxamento derivados do endotélio
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EETs	Ácidos epoxieicosatrienoicos
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HPA	Eixo Hipotálamo-pituitário-adrenal
i.m.	Via de administração intramuscular
i.p.	Via de administração intraperitoneal
i.v.	Via de administração intravenosa

L-NAME	N^{ω}-nitro-L-Arginina Metil Éster
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NOX2	NADPH oxidase
NP-40	Detergente lipofílico, Nonidet P-40
$O_2^{\bullet -}$	Ânion superóxido
p	Valor de significância
PA	Pressão arterial
PAS	Pressão arterial sistólica
PGI_2	Prostaciclina
PMSF	Fluoreto de fenilmetanossulfonilo
PPC	Pressão de perfusão coronariana
RIPA	Tampão do ensaio de radioimunoprecipitação
s.c.	Via de administração subcutânea
SHR	Rato espontaneamente hipertenso
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
T	Testosterona
TBA	Tetrabutilamônio
TBST	Solução salina Tris tamponada com Tween 20
Tris-HCl	Cloridrato de tris (hidroximetil) aminometano
TXA_2	Tromboxano A_2
U46619	Agonista do receptor de TXA_2

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares representam a principal causa de morte no mundo, com mais de 23 milhões de mortes esperadas até 2030 (Benjamin *et al.* 2018). No Brasil as doenças cardiovasculares foram responsáveis por 31 % de mortes no ano 2011 (Ribeiro *et al.* 2016). A hipertensão é considerada um dos fatores de risco mais prevalentes para doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, tais como, insuficiência cardíaca congestiva, acidente vascular cerebral, doença renal em estágio terminal, doença vascular periférica, comprometimento cognitivo e principalmente a doença coronariana (MacMahon *et al.* 1990; Vasan *et al.* 2001; Chobanian *et al.* 2003; Dregan *et al.* 2013; James *et al.* 2014). A prevalência de hipertensão é de 35 % para homens e 33 % para mulheres entre 2011 e 2014 segundo o *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), correspondendo a 86 milhões de adultos hipertensos em 2014 (Benjamin *et al.* 2018)**.** No Brasil a prevalência de hipertensão arterial em adultos é de aproximadamente 30 % (Picon *et al.* 2012)**.**

A hipertensão é uma doença poligênica, que resulta de anormalidades dos mecanismos de controle da pressão arterial que provocam alterações morfofuncionais dos vasos sanguíneos (Hamet *et al.* 1998). Para entendermos estas alterações é necessário, primeiramente, conhecer a morfologia dos vasos sanguíneos. Esses são compostos por três camadas: íntima (de células endoteliais); média (composta por células de músculo liso); e externa ou adventícia (que contém células do tecido adiposo perivascular, fibroblastos, fibras colágenas e terminações nervosas), como mostra a **figura 1** (Zhao *et al.* 2015).

Desde a descoberta, em 1980, de que a acetilcolina (ACh) requer da presença de células endoteliais para estimular a vasodilatação (Furchgott & Zawadzki 1980), a importância da camada íntima de células endoteliais para a homeostase vascular tem sido cada vez mais apreciada (Endemann & Schiffrin 2004). A camada íntima é composta pelo endotélio, o maior órgão parácrino do corpo (Cooke 2000; Spronk *et al.* 2004) que é capaz de detectar estímulos mecânicos (pressão e o estresse de cisalhamento), hormonais, e substâncias vasoativas. Além disso, libera agentes vasoativos e modula processos inflamatórios que podem afetar a hemostasia (Endemann & Schiffrin 2004).

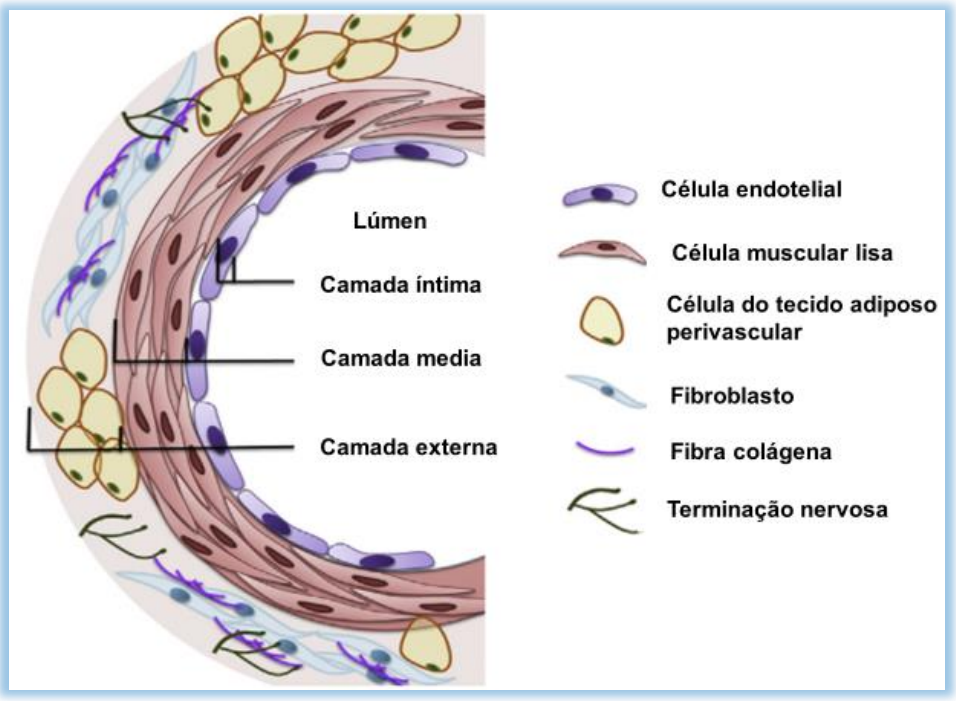

Figura 1. Estrutura da parede arterial. A parede arterial é composta de três camadas: íntima (células endoteliais e membrana elástica interna), média (células musculares lisas e membrana elástica externa) e externa (adventícia; que contém células do tecido adiposo perivascular, fibroblastos, fibras colágenas e terminações nervosas). Adaptado de Zhao et al (2015).

O endotélio produz os fatores de relaxamento derivados do endotélio (EDRFs), dentre eles, oxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI_2) e a hiperpolarização dependente do endotélio (EDH) (Dusting *et al.* 1977; Palmer *et al.* 1987; Félétou & Vanhoutte 2006; Michel & Vanhoutte 2010; Félétou & Vanhoutte 2013). Por outro lado, produz também os fatores de contração derivados do endotélio (EDCFs), a saber, endoperóxidos, PGI_2, TXA_2, isoprostanos e espécies reativas de oxigênio (EROs) (Tang & Vanhoutte 2009), endotelina-1 e angiotensina II (ANG II) (Schiffrin 2001). O grande problema é que na hipertensão ocorre um desequilíbrio na síntese destes fatores vasoativos com predomínio dos fatores de contração (Puddu *et al.* 2000; Endemann & Schiffrin 2004).

A disfunção endotelial pode ser caracterizada por uma redução na geração e biodisponibilidade dos EDRFs, em especial do NO, enquanto os fatores contráteis derivados do endotélio são aumentados (Lerman & Burnett 1992) comprometendo a vasodilatação. Ademais, a disfunção endotelial participa na fisiopatologia da hipertensão, doença arterial periférica, diabetes e insuficiência cardíaca e renal crônica (Bonetti *et al.* 2003; Endemann & Schiffrin 2004). A disfunção endotelial pode ser caracterizada também por um ambiente pró-inflamatório, proliferativo e pró-

coagulante que favorece à aterogênese (Anderson 1999) levando a uma progressão e complicações da aterosclerose, principal causa da doença coronariana, a aterosclerose coronariana (Kinlay & Ganz 1997).

Muitos fatores de risco cardiometabólico facilitam o desenvolvimento da aterosclerose coronariana, que é caracterizada pela formação de uma placa aterosclerótica na coronária provocando uma estenose e consequentemente redução do fluxo sanguíneo coronariano (**figura 2**) e um desequilíbrio na manutenção do tônus coronariano (Schoenhagen *et al.* 2000).

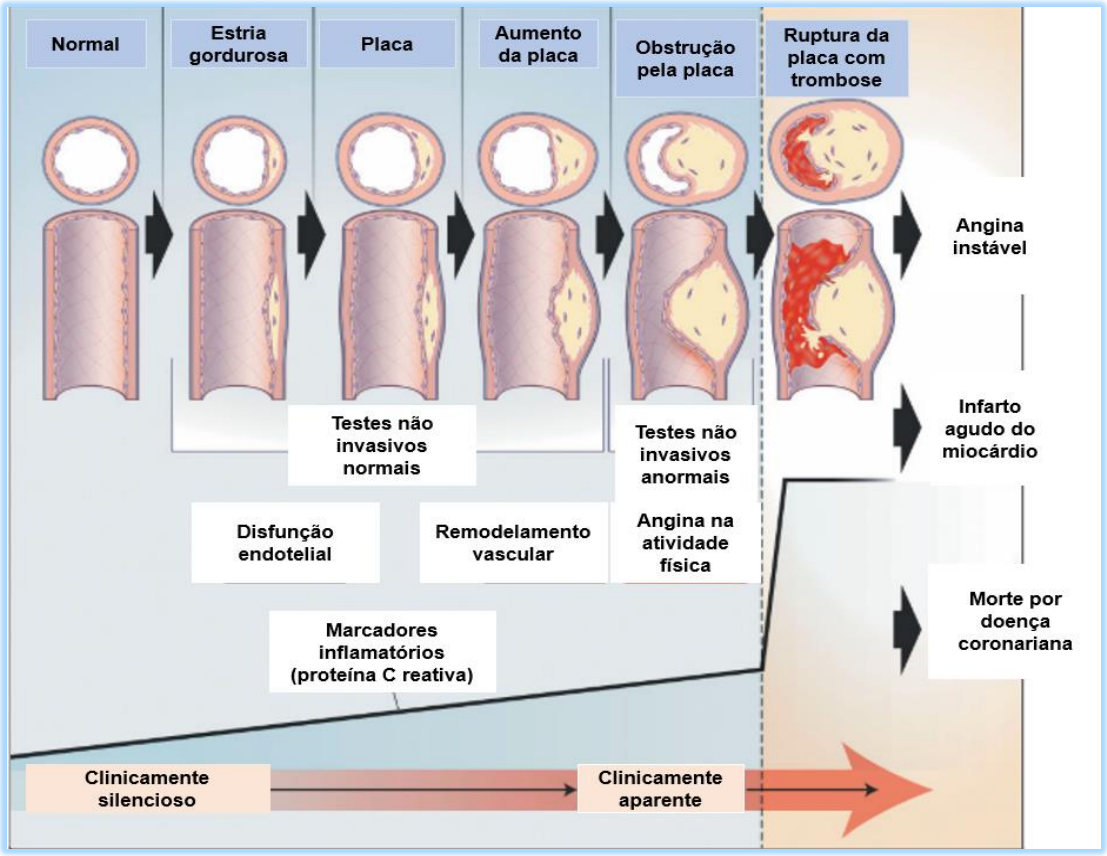

Figura 2. Progressão típica da aterosclerose coronariana. À medida que a carga da placa aterosclerótica aumenta, a massa aterosclerótica tende a permanecer externa ao lúmen, o que permite que o diâmetro do lúmen seja mantido; isto é conhecido como o efeito de *Glagov* ou remodelação positiva. À medida que a placa aterosclerótica penetra no lúmen, o diâmetro da artéria coronária diminui. A isquemia miocárdica resulta de uma relação discordante de suprimento sanguíneo coronariano ao consumo de oxigênio pelo miocárdio. O estreitamento luminal de mais de 65 a 75 % pode resultar em isquemia transitória e angina. Nas síndromes coronarianas agudas, a placa vulnerável é um fator mais importante do que o grau de estenose; eventos coronarianos agudos resultam de ulceração ou erosão da capa fibrosa, com trombose intraluminal subsequente. A placa vulnerável dentro da parede do vaso pode não ser obstrutiva e, portanto, pode permanecer clinicamente silenciosa até causar ruptura e consequências associadas. Adaptado de Abrams (2005).

A manutenção do tônus vascular coronariano depende da homeostase dos agentes vasoconstritores e vasodilatadores. A resposta vasodilatadora reduzida e a

vasoconstrição aumentada podem prejudicar ainda mais o fluxo sanguíneo coronariano exacerbando os sintomas clínicos e perpetuando a disfunção vascular, que também pode levar a vasoespasmo coronariano e, por exemplo, agravar os sintomas da angina na doença coronariana (Kelly & Jones 2013a).

A circulação coronariana fornece ao miocárdio oxigênio e nutrientes para assegurar a função normal e a viabilidade do coração devido à sua limitada capacidade anaeróbica do coração (Ballinger & Vollenweider 1962; Opie 1969; Braunwald 1971). Assim, a resistência vascular coronariana deve ser continuamente regulada para fornecer quantidades suficientes de oxigênio e nutrientes para atender a qualquer mudança na demanda do tecido miocárdico circundante (Feigl 1983; Duncker & Bache 2008; Tune 2014).

Entende-se que a regulação do fluxo sanguíneo coronariano é ditada por meio de múltiplos mecanismos: forças de compressão extra-vascular (pressão tecidual); pressão de perfusão coronariana (PPC); controles endotelial, metabólico e miogênico; bem como influências neurais e hormonais. Juntos, esses mecanismos regem o fluxo coronariano e atuam para garantir um equilíbrio geral entre a oferta de oxigênio pelo miocárdio (suprimento) e o metabolismo (demanda) como mostra a **figura 3** (Feigl 1983; Ardehali & Ports 1990; Tune *et al.* 2004; Duncker & Bache 2008; Tune 2014).

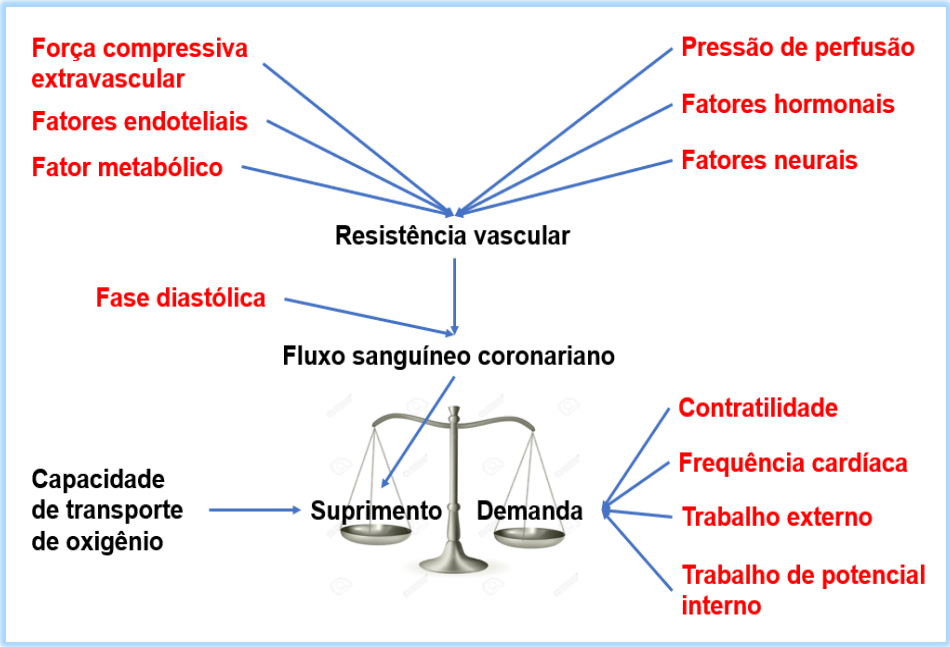

Figura 3. Diagrama esquemático dos determinantes da oferta e demanda de oxigênio miocárdico. Adaptado de Ardehali e Ports (1990) e Tune (2014).

O fluxo sanguíneo em massa, definido como o movimento resultante de um gradiente de pressão, pode ser matematicamente descrito no sistema vascular como um correlato à Lei de Ohm:

Fluxo sanguíneo = Δ pressão / Resistência vascular

Portanto, a alteração da regulação fisiológica do fluxo sanguíneo coronariano produzida pela disfunção endotelial, seguida da aterosclerose das coronárias provoca um desbalanço entre a oferta e demanda de oxigênio miocárdico. Diante deste contexto, estudos têm demonstrado que homens apresentam maior risco de desenvolver doença coronariana e hipertensão em comparação com mulheres na pré-menopausa (Messerli *et al.* 1987; Khaw & Barrett-Connor 1988; Farhat *et al.* 1996; Benjamin *et al.* 2018). Fato este, que tem indicado o papel cardioprotetor do estrogênio (Stampfer *et al.* 1991). Contudo, estudos clínicos e epidemiológicos têm indicado uma relação entre a testosterona e doenças cardiovasculares (Barrett-Connor & Khaw 1988; Adams *et al.* 1995; Barrett-Connor 1997; Liu *et al.* 2003). Desta forma, o sexo masculino é considerado como fator de risco independente para desenvolvimento destas doenças (Oskui *et al.* 2013; Kelly & Jones 2014), o que, em tese, estaria relacionado à presença de testosterona (Reckelhoff *et al.* 1998, 1999a, 2000a; Reckelhoff 2018).

A testosterona é um hormônio esteroide sintetizada principalmente nos testículos (95%). Parte da testosterona (7 %) é reduzida a DHT pela 5α-redutase, e outra parte (cerca de 0,5 %) é convertida em E_2 pela aromatase (CYP19A1) como mostra a **figura 4** (Oettel 2004; Brinkmann 2011; Marcelli 2017). Pequenas quantidades de testosterona também são secretadas pela zona reticular das glândulas suprarrenais (Oettel 2004; Morales 2013). A maior parte da testosterona circulante está ligada à proteínas plasmáticas (Dunn *et al.* 1981) e cerca de 2 % da testosterona se encontra em sua forma livre que corresponde a sua fração biologicamente ativa (Dunn *et al.* 1981; Pardridge 1986).

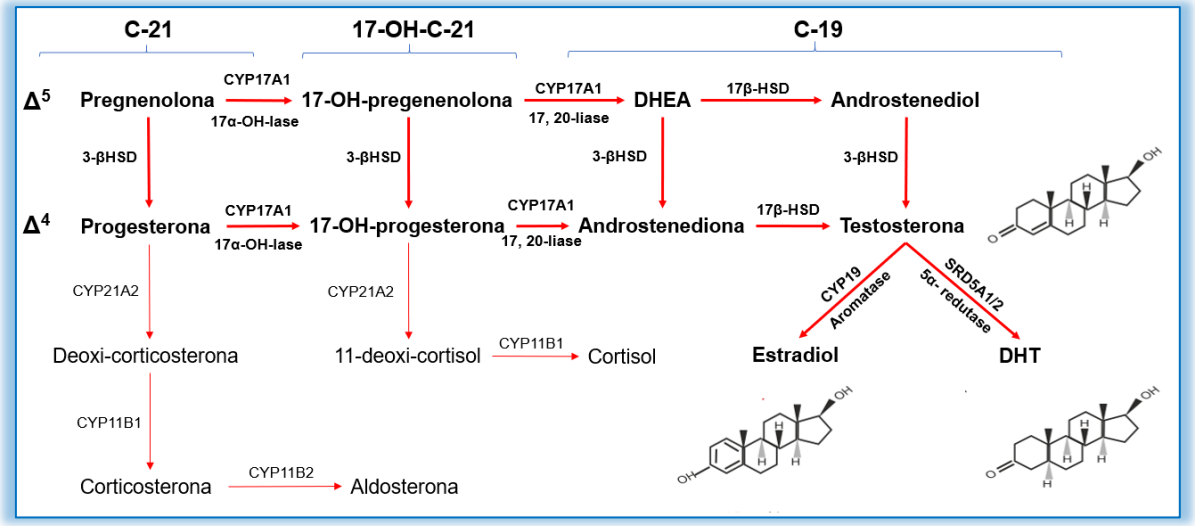

Figura 4. Principais vias da esteroidogênese adrenal, ovariana e testicular, mostrando os metabólitos intermediários, produtos finais e enzimas envolvidas. Via Δ^5: metabólitos da via Δ^5 caracterizados pela presença de dupla ligação entre os carbonos 5 e 6. Via Δ^4: metabólitos da via Δ^4, caracterizada por dupla ligação entre os carbonos 4 e 5. C-21: todos os intermediários indo de pregnenolona para aldosterona tem 21 átomos de carbono (C-21). 17-OH-C-21: Todos os intermediários que vão da 17-OH-pregnenolona ao cortisol têm 21 átomos de carbono e um grupo OH na posição 17. A enzima 17-20-liase remove os átomos de carbono 20 e 21 para produzir esteroides C-19. Adaptado de Marcelli (2017).

As ações da testosterona no organismo ocorrem por via clássica ou genômica (Bennett *et al.* 2010), no qual a testosterona ao se ligar em seu receptor específico - receptor de andrógenos (AR) - promove uma alteração conformacional o que permite a translocação desse complexo (hormônio-receptor) até o núcleo, através dos poros da membrana nuclear, seguido do aumento da fosforilação e formação do homodímero (Claessens *et al.* 2001) ou heterodímero (Lee *et al.* 1999). Em seguida, ocorre uma interação desse complexo com os elementos responsivos aos andrógenos dando início à transcrição gênica (Claessens *et al.* 2001). A testosterona também pode atuar por vias não-genômicas, caracterizada por respostas rápidas, indicando ausência da transcrição e tradução gênica (Bennett *et al.* 2010). Estas ações podem envolver a interação do hormônio com AR presente na membrana plasmática (Deenadayalu *et al.* 2012; Puttabyatappa *et al.* 2013) ou de maneira independente desses receptores (Jones *et al.* 2004; Álvarez *et al.* 2010).

A testosterona desempenha várias ações no organismo, entre elas, a maturação dos órgãos sexuais masculinos e desenvolvimento das características sexuais secundárias (crescimento da barba, pelos axilares e pubianos e mudanças da

voz). Ela também participa na espermatogênese e contribui para o desejo sexual, e possui efeitos anabólicos, incluindo o aumento da massa muscular, densidade e maturação óssea (Kloner *et al.* 2016). Além desses efeitos, estudos apontam que a testosterona pode exercer efeitos sobre o sistema cardiovascular (Liu *et al.* 2003a; Thompson & Khalil 2003; Wu & Von Eckardstein 2003; Littleton-Kearney & Hurn 2004; Traish *et al.* 2014), tais como: (*i*) estimular o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (Peach 1977; Reckelhoff *et al.* 2000b; Fischer *et al.* 2002), (*ii*) aumentar a expressão de receptores α (Tsang *et al.* 2008, 2009) e β (Xu *et al.* 1991; Tsang *et al.* 2009) adrenérgicos e (*iii*) modular o metabolismo, estoque, liberação e recaptação de norepinefrina em neurônios simpáticos (Salt 1972). Todas essas evidências nos levam a sugerir que a testosterona poderia apresentar efeitos deletérios sobre o sistema cardiovascular. No entanto, estudos têm demonstrado que a testosterona induz relaxamento em anéis vasculares de humanos (Yildiz *et al.* 2005; Seyrek *et al.* 2007; Smith *et al.* 2008; Rowell *et al.* 2009) e em anéis vasculares de diferentes espécies animais (Yue *et al.* 1995; Chou *et al.* 1996; Costarella *et al.* 1996; Crews & Khalil 1999; Honda *et al.* 1999; English *et al.* 2000a; Deenadayalu *et al.* 2001, 2012; Ding & Stallone 2001; Tatchum-Talom *et al.* 2002; Tep-areenan *et al.* 2002; Toot *et al.* 2011; Ramírez-Rosas *et al.* 2011; Puttabyatappa *et al.* 2013).

Estes efeitos sobre os vasos são dependentes da concentração de testosterona. Alguns estudos têm demostrado que em concentrações fisiológicas (< 100 nM), a resposta vasodilatadora induzida pela testosterona pode ocorrer por meio da geração de NO endotelial (Teoh *et al.* 2000; Perusquía & Stallone 2010). Por outro lado, concentrações maiores a 100 nM (farmacológicas e suprafisiológicas) podem levar a ativação dos canais para potássio (Tep-areenan *et al.* 2002; Deenadayalu *et al.* 2012) ou para cálcio (Jones *et al.* 2003; Montaño *et al.* 2008) levando ao relaxamento ou contração do músculo liso vascular, respetivamente (Teoh *et al.* 2000; Perusquía & Stallone 2010). Herman *et al*. (1997) relacionaram baixas concentrações de testosterona à melhora no relaxamento dependente do endotélio em artéria braquial de homens adultos. Em contrapartida, Haring *et al.* (2012) indicaram que baixos níveis de testosterona endógena estão associados a um aumento do risco de morte por doenças cardiocirculatórias. McCredie *et al.* (1998) mostraram que o tratamento com doses suprafisiológicas de testosterona prejudica a reatividade vascular de artéria braquial de mulheres transexuais. Porém, tanto a administração

aguda com altas doses de testosterona (Rosano *et al.* 1999; Webb *et al.* 1999) quanto com doses infrafisiológicas (English *et al.* 2000b) são capazes de melhorar a tolerância ao exercício, além de reduzir o limiar de angina em homens com doença coronariana. Diante disso, nota-se que os estudos acerca das ações da testosterona não são conclusivos e muitas vezes controversos.

Uma das doenças relacionadas com baixos níveis de testosterona é o hipogonadismo masculino, uma condição clínica caracterizada por uma produção gonadal inadequada de espermatozoides e/ou testosterona devido a uma falha testicular intrínseca ou a uma estimulação subótima pelas gonadotrofinas hipofisárias, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) (Buvat *et al.* 2013). Entre as comorbidades associadas ao hipogonadismo, em estudo realizado em uma população com 2.000 homens, encontrou uma correlação entre baixos níveis de testosterona e hipertensão (Mulligan *et al.* 2006).

Sabendo que há uma relação entre testosterona e hipertensão, torna-se importante estudos que avaliem o impacto desta relação para o fluxo coronariano. Diante deste contexto, faz necessário a utilização de um modelo animal que mimetize a hipertensão essencial. Os ratos espontaneamente hipertensos (SHRs) foram desenvolvidos por endogamia genética que uniformemente resultou em 100% da progênie tendo hipertensão arterial natural (Okamoto & Aoki 1963). Desde então, os SHRs vêm sendo um excelente modelo de hipertensão essencial (Udenfriend & Spector 1972). A pressão arterial média é de aproximadamente 190 a 200 mmHg, e caracteriza a fase sustentada da hipertensão em SHR (Trippodo & Frohlich 1981). Neste momento, os SHRs apresentam alterações cardiovasculares tais como: hipertrofia cardíaca e vascular e disfunção endotelial (Trippodo & Frohlich 1981; Engelmann *et al.* 1987). Durante os estágios iniciais estáveis e a fase de desenvolvimento da hipertensão, a elevação da pressão arterial é mantida em grande parte pelo aumento do fluxo neural simpático central (Buccafusco 1996). Nos estágios mais avançados, a resistência periférica total aumentada com um débito cardíaco normal e a permeabilidade diminuída das membranas glomerulares formam a base para a manutenção da hipertensão a longo prazo (Beierwaltes & Arendshorst 1978). Neste contexto, já foram estudados o papel da testosterona na modulação da pressão arterial em SHR.

Assim , os estudos indicam que a testosterona exerce grande influência sobre níveis pressóricos sanguíneos em modelos experimentais de hipertensão via SRAA e indiretamente sobre o sistema NADPH oxidase [NOX] (Reckelhoff *et al.* 1999b, 2000b; Fortepiani & Reckelhoff 2005). Adicionalmente, estudos demonstraram que a testosterona pode modular a expressão da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), COX-1, COX-2 em aorta e mesentérica (Blanco-Rivero *et al.* 2005, 2006a, b, 2007; Martín *et al.* 2005; Martorell *et al.* 2007a) e também a expressão dos canais para potássio dependentes de voltagem (K_V^+) em aorta de ratos (Zhou *et al.* 2008). Tomados juntamente, esses achados atribuem à testosterona um papel modulador sobre o aparelho cardiovascular.

Diante de estudos relacionados ao papel modulador da testosterona sobre a função vascular, ainda não há evidências conclusivas de contribuição de forma adversa no desenvolvimento das doenças cardiovasculares (Carson III & Rosano 2012). Pelo contrário, estudos sugerem que a reposição com testosterona pode melhorar os fatores de risco para doenças que acometem os vasos coronarianos, como por exemplo, a aterosclerose coronariana (Jones & Saad 2009; Jones 2010; Kelly & Jones 2013b). Além disso, estudos clínicos indicam baixos níveis de testosterona em populações de homens hipertensos (Barrett-Connor & Khaw 1988; Khaw & Barrett-Connor 1988; Hughes *et al.* 1989; Phillips *et al.* 1993; Simon *et al.* 1997; Svartberg *et al.* 2004). Diante do exposto, nossa hipótese é que a terapia de reposição com doses fisiológicas de testosterona seria capaz de modular as alterações na reatividade vascular coronariana induzidas pela deficiência de testosterona em ratos espontaneamente hipertensos orquiectomizados.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

- Avaliar os efeitos da deficiência hormonal e da terapia de reposição com doses fisiológicas de testosterona sobre a reatividade vascular coronariana em SHR orquiectomizado.

2.2. ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da orquiectomia e da terapia de reposição com doses fisiológicas de testosterona sobre os dados ponderais de SHR;

- Avaliar os efeitos da orquiectomia e da terapia de reposição com doses fisiológicas de testosterona por 15 dias sobre a PAS de SHR;

- Avaliar os efeitos da orquiectomia e da terapia de reposição com doses fisiológicas de testosterona sobre a pressão de perfusão coronariana (PPC) basal em coração isolado de SHR;

- Avaliar a participação dos principais EDRFs na manutenção da PPC basal de SHR orquiectomizado e tratado com doses fisiológicas de testosterona;

- Avaliar os efeitos da orquiectomia e da terapia de reposição com doses fisiológicas de testosterona, sobre a reatividade vascular coronariana induzida pela BK em coração isolado de SHR;

- Avaliar os efeitos do tratamento com inibidor da aromatase (AI) sobre a PAS, PPC basal e a reatividade vascular coronariana induzida pela BK em SHR orquiectomizado e tratado com doses fisiológicas de testosterona;

- Avaliar a participação dos principais EDRFs na vasodilatação induzida pela BK no leito vascular coronariano em coração isolado de SHR orquiectomizado e tratado com doses fisiológicas de testosterona;

- Determinar a expressão proteica da eNOS, COX-1, COX-2, gp91phox e Akt em artérias coronárias de SHR orquiectomizado e tratado com doses fisiológicas de testosterona;

- Determinar a produção de NO, ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) e peroxido de hidrogênio (H_2O_2) em artérias coronárias de SHR orquiectomizado e tratado com doses fisiológicas de testosterona.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados 187 SHR machos, com 10 semanas de idade, pesando entre 200 a 250 g, fornecidos pelo biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, quatro animais por gaiola, com livre acesso a água e ração (Nuvilab CR-1), em sala com temperatura (22-24 °C) e umidade (40-60 %) controladas. O ciclo de luz claro/escuro foi alternado a cada 12/12 horas. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES) sob o número de protocolo 62/2017. Além disso, todos os procedimentos e cuidados dos animais foram baseados na diretriz do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA-MCT 2016).

3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos experimentais:

- Grupo controle com cirurgia fictícia (SHAM, n=40);
- Grupo orquiectomizado (ORX, n=40);
- Grupo ORX+ tratamento com doses fisiológicas de T (ORX+T, n=40);
- Grupo ORX + T+ inibidor da aromatase (anastrozol, AI) [ORX+ T+ AI, n=15].

O grupo ORX + T + AI, foi analisado com a finalidade de descartar uma possível participação do estradiol, produto da conversão da testosterona pela enzima aromatase, nas respostas encontradas no presente estudo sobre a PAS, PPC basal e a reatividade vascular coronariana induzida pela BK no grupo ORX + T. Uma vez que os resultados que serão aqui apresentados não mostraram diferenças entre os grupos ORX + T vs. ORX + T + AI, seguimos os sem este último grupo. A **figura 5** resume uma linha do tempo das avaliações realizadas.

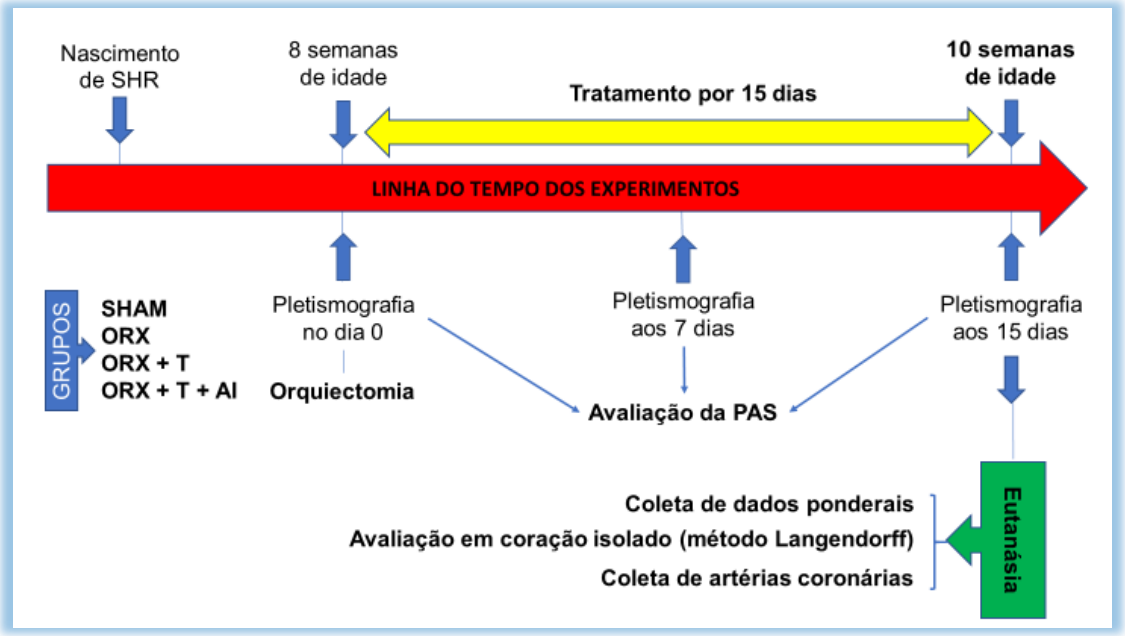

Figura 5. Linha do tempo dos experimentos realizados em SHR.

3.3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.3.1. Orquiectomia

Ratos SHR com 8 semanas de idade foram anestesiados com cetamina (70 mg/Kg, *i.p.*) e xilazina (10 mg/Kg, *i.p.*). Em seguida, foram colocados em decúbito dorsal e fixados sobre uma mesa cirúrgica. Após anti-sepsia com álcool iodado da pele da bolsa testicular, foram colocados campos cirúrgicos esterilizados ao redor da área cirúrgica. A cirurgia foi realizada por meio de uma incisão da pele na região da linha mediana da bolsa testicular. Assim, a túnica *vaginalis* foi aberta e o testículo foi exposto por compressão. Após exposição do testículo, o cordão espermático foi clampeado, ligado, seccionado e o testículo foi removido. Ao término, a pele da bolsa testicular foi suturada com fio de náilon monofilamentar 4-0. O grupo SHAM foi submetido aos mesmos procedimentos, porém sem extração dos testículos nem ligadura do cordão espermático. Ao final, os animais receberam analgésico (Flunixin meglumine, 2,5 mg / Kg, *i.m*, Chemitec ®, Brasil) e antibiótico (Enrofloxacina, 10 mg / Kg, *i.m*, Chemitec ®, Brasil.). No mesmo dia da cirurgia, após o procedimento cirúrgico, todos os animais receberam o tratamento correspondente.

3.3.2. Terapia de reposição com testosterona

O tratamento de reposição com testosterona (Testosterona Bioidêntica – IMAFAR) no grupo ORX+T foi realizado durante 15 dias, por via subcutânea (*s.c.*) na concentração de 0,5 mg /Kg/dia, mimetizando a concentração fisiológica, como previamente foi realizado em nosso laboratório por Moysés *et al.* (2001). Os grupos SHAM e ORX receberam somente o mesmo volume do veículo utilizado para diluir a testosterona (óleo de girassol) por via *s.c.* (Moysés *et al.* 2001). O grupo ORX+T+AI foi tratado com anastrozol, inibidor da aromatase (AI), diluído em solução salina (0.9 %) numa dose de 0.1 mg/Kg/dia, via gavagem (Altintas *et al.* 2010). Os animais tratados com testosterona receberam a primeira dose no mesmo dia da orquiectomia, para evitar baixos níveis hormonais no período pós-operatório.

3.3.3. Avaliação não invasiva da pressão arterial

Os ratos foram submetidos a um período de adaptação por três dias antes do início da aferição da PA. Os ratos foram colocados numa câmara externa aquecida a 37 °C por 10 minutos e após foram transferidos para uma câmara de contenção, mantendo a mesma temperatura. Em seguida foi colocado o manguito pneumático (pletismógrafo - IITC INC / *Life Science*, 23924 *Victory Blvd, Woodland Hills*, CA 91367-1253 EUA) na região proximal da cauda, o qual foi insuflado e desinsuflado automaticamente até que os ratos permaneceram em repouso. Após adaptação por 5 minutos na câmara de contenção, foram obtidos 5 registros da PAS. Foram considerados os registros com variação não superior a 5 mmHg para um mesmo rato. Os registros associados ao movimento dos animais foram descartados (Ibrahim *et al.* 2006; Fritz & Rinaldi 2008). A aferição da PAS foi realizada um dia antes do procedimento cirúrgico, às 8 semanas de idade (dia 0) e após 7 e 15 dias.

3.3.4. Dados ponderais

Após tratamento com testosterona por 15 dias, o peso dos ratos foi obtido antes dos procedimentos experimentais em cada grupo. Após anestesia com cetamina (70 mg/kg, *i.p.*) e xilazina (10 mg/kg, *i.p.*), os corações foram imediatamente removidos para análise de reatividade vascular e a próstata, vesícula seminal, as glândulas

adrenais e a pituitária foram cuidadosamente dissecados. Em seguida, os órgãos foram pesados e a tíbia esquerda retirada. Após, foi avaliado o peso relativo dos órgãos por meio da razão do peso úmido (mg) pelo comprimento da tíbia (mm), com a finalidade de excluir variações em relação ao tamanho dos ratos.

3.3.5. Método de estudo de coração isolado

Após anestesia com cetamina (70 mg/kg, *i.p.*) e xilazina (10 mg/kg, *i.p.*), os animais foram heparinizados (100 UI, *i.v.*) num volume de 100 µL pela veia jugular direita (Bell *et al.* 2011). Após, os ratos foram sacrificados e os corações foram removidos e rápidamente transferidos para o aparelho de perfusão retrógrada [método de Langendorff] (*Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten*) por meio da canulação da aorta (Bell *et al.* 2011). Os corações foram perfundidos com solução de Krebs modificada contendo o seguinte: 120 mM NaCl, 1,26 mM $CaCl_2.2H_2O$, 5,4 mM KCl, 2,5 mM $MgSO_4.7H_2O$, 2 mM $NaH_2PO_4.H_2O$, 27 mM $NaHCO_3$, 1,2 mM Na_2SO_4, 0,03 mM EDTA e 11 mM glicose (Santos *et al.* 2010). A solução de Krebs foi mantida aquecida a 37 ° C e continuamente aerada com mistura carbogênica contendo 5 % de CO_2 e 95 % de O_2, estabilizando pH a 7,4. Como mostrado em (Skrzypiec-Spring *et al.* 2007) e esquematizado na **figura 6**.

Um balão de látex ainda vazio, preso a uma cânula de aço conectada a um transdutor de pressão (Instrumento MLT0380 / Transdutor Reusável BP) foi introduzido no ventrículo esquerdo através da válvula mitral e em seguida preenchido com água até atingir uma pressão de 10 mmHg (correspondente à pré-carga ventricular) por meio de uma seringa milimétrica. Esse nível de pré-carga mimetiza a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE) o que corresponde a uma pressão isovolumétrica do ventrículo esquerdo (PIVVE) ideal para ratos (Bell *et al.* 2011). Um fluxo constante de 10 mL/min, ideal para ratos (Bell *et al.* 2011), foi mantido por uma bomba peristáltica (canais MS-Reglo 4, *Hugo Sachs Electronics*, Alemanha) para a perfusão retrógrada do leito vascular coronariano por meio da aorta.

A pressão de perfusão coronariana (PPC), produto do fluxo pela resistência do leito vascular coronariano (Goodwill *et al.* 2017) foi avaliada por meio de um transdutor de pressão (Instrumento MLT0380 / Transdutor Reusável BP), conectado imediatamente após à cânula de perfusão aórtica, que por sua vez acoplado a um

sistema digital de aquisição de dados (Sistema PowerLab). Os registros foram obtidos por meio do *LabChart 7.3.1* (*Copyright © 1994-2011 ADInstruments*). Tendo em vista que o fluxo utilizado na preparação foi constante, as alterações da PPC foram diretamente relacionadas às mudanças na resistência vascular do leito coronariano.

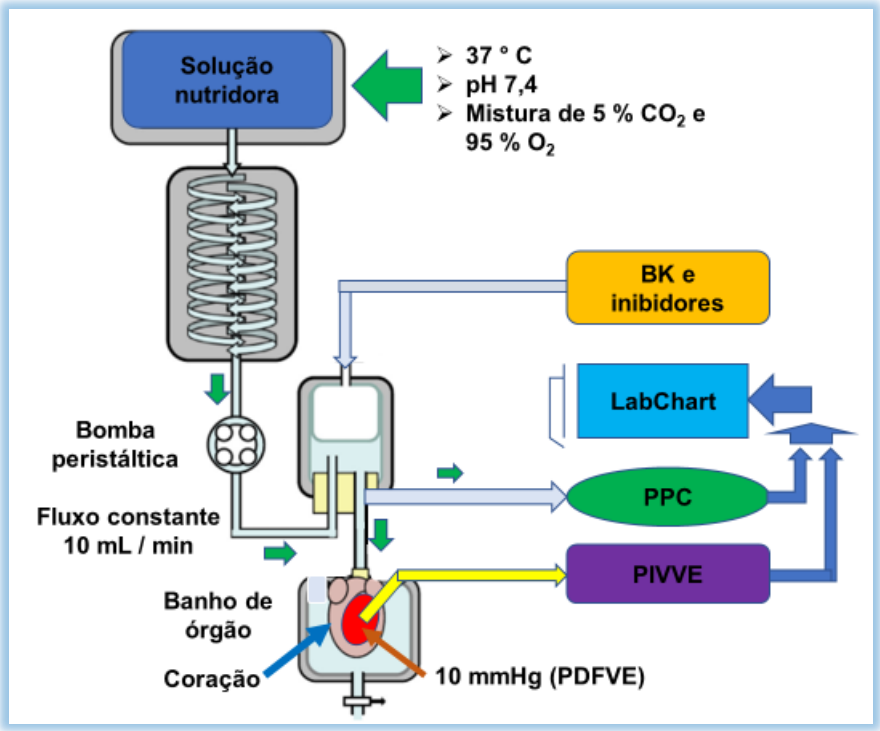

Figura 6. Sistema de Langendorff com fluxo constante. O coração foi canulado por meio da aorta e perfundido retrogradamente, e suspenso dentro de um banho de órgão aquecido. Um braço lateral, acoplado à cânula de perfusão aórtica, foi utilizado para obter a PPC por meio de um transdutor de pressão. Um balão de látex esvaziado, conectado a uma cânula foi inserido no ventrículo esquerdo e preenchida com água, sem bolhas de ar, a uma pressão de 10 mmHg (PDFVE), a partir do qual a pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo foi medida pelo transdutor de pressão (PIVVE). Uma bomba peristáltica fornece um fluxo constante de solução nutridora para o coração. Todo o sistema mantem a temperatura da solução nutridora continuamente aquecida a 37 ° C por meio de um banho maria. Adaptado de Bell *et al.* (2011).

Após estabilização (40 minutos) foram obtidas a PPC basal e logo após foram construídas curvas dose-resposta à BK (Sigma, St. Louis, MO). Em seguida, cada coração foi perfundido com um inibidor ou inibidores durante 20 min, de acordo com os protocolos experimentais e finalmente foram construídas novamente curva dose-resposta à BK (**figura 7**).

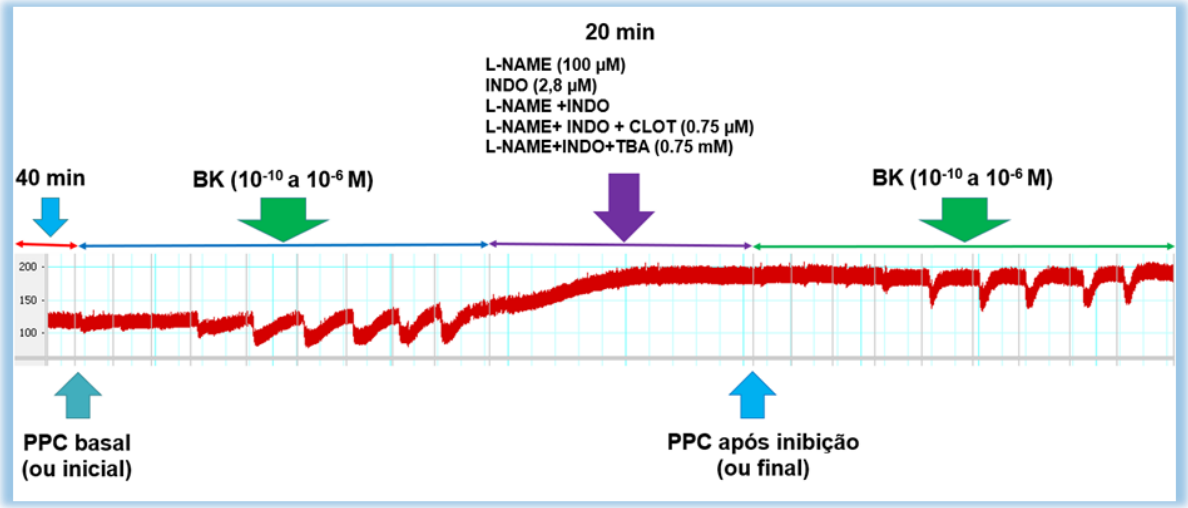

Figura 7. Linha do tempo dos protocolos de reatividade vascular coronariana em coração isolado de SHR. Começa com a estabilização do coração por 40 minutos, logo a obtenção da PPC basal (ou inicial) seguido da primeira curva de relaxamento à BK, a perfusão dos inibidores por 20 minutos, a obtenção da PPC após inibição (ou final), seguida pela segunda curva de relaxamento à BK nas mesmas doses e com intervalos semelhantes entre dose e dose em relação à primeira curva, para evitar o fenômeno da taquifilaxia à BK.

A resposta relaxante à BK foi calculada pela seguinte equação:

$$\Delta\ (\%) = 100 - \left(\frac{PPC_{\ após\ perfusão\ do\ inibidor} \times 100}{PPC_{\ antes\ da\ perfusão\ do\ inibidor}}\right)$$

Protocolos Experimentais

Foram realizados 5 protocolos experimentais (n = 8 para cada protocolo). Dessa forma, para os 3 grupos estudados foram utilizados total de 120 animais. Destes animais foram obtidos o peso corpóreo, o peso relativo dos órgãos, PAS, PPC basal (inicial), PPC final, as curvas de relaxamento à BK, e os mediadores que participam na modulação da PPC e do relaxamento à BK do leito vascular coronariano.

Protocolo 1

Para avaliar a participação do oxido nítrico na modulação da PPC e do relaxamento à BK do leito vascular coronariano, primeiro foi obtido a PPC basal (inicial), logo foi construído uma curva dose-resposta à BK pela administração de doses consecutivas crescentes *in bolus* (10^{-10} a 10^{-6} M), seguidamente foi perfundido com 100 µM de N^{ω}-nitro-L-arginina metil-éster (L-NAME, inibidor não específico da enzima óxido nítrico síntase -NOS) durante 20 minutos, após foi obtido a PPC final e foi realizado uma segunda curva dose-resposta à BK.

Protocolo 2

Para avaliar a participação dos prostanóides [por exemplo PGI_2] na modulação da PPC e no relaxamento à BK do leito vascular coronariano, primeiro foi obtido a PPC basal (inicial), logo foi construído uma curva dose-resposta à BK pela administração de doses consecutivas crescentes *in bolus* (10^{-10} a 10^{-6} M), seguidamente foi perfundido com 2,8 µM de indometacina (INDO, inibidor não específico da enzima ciclooxigenase - COX) durante 20 minutos, após foi obtido a PPC final e foi realizado uma segunda curva dose-resposta à BK.

Protocolo 3

Para avaliar a participação de NO e dos prostanóides [por exemplo PGI_2] na modulação da PPC e no relaxamento à BK do leito vascular coronariano, primeiro foi obtido a PPC basal (inicial), logo foi construído uma curva dose-resposta à BK pela administração de doses consecutivas crescentes *in bolus* (10^{-10} a 10^{-6} M), seguidamente foi perfundido com 100 µM de L-NAME + 2,8 µM de INDO (Fulton *et al.* 1995, 1997, 1998) durante 20 minutos, após foi obtido a PPC final e foi realizado uma segunda curva dose-resposta à BK.

Protocolo 4

Para demonstrar a participação dos metabolitos da CYP (EETs) como provável EDH na modulação da PPC e no relaxamento à BK do leito vascular coronariano,

primeiro foi obtido a PPC basal (inicial), logo foi construído uma curva dose-resposta à BK pela administração de doses consecutivas crescentes *in bolus* (10^{-10} a 10^{-6} M), seguidamente foi perfundido com 100 µM de L-NAME + 2,8 µM de INDO + 0,75 µM de clotrimazol (CLOT, inibidor da enzima epoxigenase - CYP) durante 20 minutos, após foi obtido a PPC final e foi realizado uma segunda curva dose-resposta à BK.

Protocolo 5

Para demonstrar a participação dos canais para potássio (na provável resposta mediada pelo EDH) na modulação da PPC e no relaxamento à BK do leito vascular coronariano, primeiro foi obtido a PPC basal (inicial), logo foi construído uma curva dose-resposta à BK pela administração de doses consecutivas crescentes *in bolus* (10^{-10} a 10^{-6} M), seguidamente foi perfundido com 100 µM de L-NAME + 2,8 µM de INDO + 0,75 mM de Tetrabutilamônio bissulfeto (TBA, bloqueador não específico dos canais para potássio) durante 20 minutos, após foi obtido a PPC final e foi realizado uma segunda curva dose-resposta à BK (Moazed *et al.* 2009).

3.3.6. Dissecção das artérias coronárias

Para dissecção das coronárias, os animais foram anestesiados com cetamina (70 mg/kg, *i.p.*) e xilazina (10 mg/kg, *i.p.*) e logo foram eutanasiados por decapitação. Em seguida, a cavidade torácica foi aberta, e o coração foi removido e colocado em solução fria de Krebs modificada contendo: 120 mM NaCl, 1,25 mM $CaCl_2.2H_2O$, 5,4 mM KCl, 2,5 mM $MgSO_4.7H_2O$, 2 mM NaH_2PO_4. H_2O, 27 mM $NaHCO_3$, 1,2 mM Na_2SO_4, 0,03 mM EDTA e 11 mM glicose) a um pH 7,4 para o procedimento de dissecção. Em seguida, os ramos descendente anterior e septal foram isolados por meio de um microscópio de dissecção (M900, F. Vasconcelos, São Paulo, Brasil).

Para avaliação molecular os tecidos dissecados foram congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80 ° C até serem utilizados. Já para as análises de microscopia de fluorescência, as coronárias foram lavadas em solução de Krebs-HEPES gelada, em seguida permaneceram em solução de Krebs-HEPES com 10 % de sacarose por, pelo menos, 6 horas. Após, as artérias foram incorporadas em meio de congelamento Tissue-Tek® O.C.T.™ (Sakura®, USA), congeladas e

posteriormente cortes de secções transversais (10µm) foram obtidos por meio de um criostato (Leica 1850, Leica, USA). Os cortes foram fixados em lâminas de vidro.

3.3.7. Western blotting

As coronárias para análise de *Western blotting* foram obtidas em forma simultânea com os outros protocolos experimentais ao longo do trabalho, com um n=8 para cada grupo, com um total n= 24 ratos. Devido à pouca proteína obtida de cada rato, amostras de dois ratos do mesmo grupo foram misturadas para obter uma quantidade razoável de proteína total, resultando no final em um n=4 por grupo.

As artérias coronárias de cada grupo, foram maceradas em 25 µL de RIPA suplementado com inibidores de protease e fosfatase (65,2 mM Tris-HCl, 154 mM NaCl, 1 % NP-40, 0,25 % deoxicolato de sódio, 0.8 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 mM ortovanadato de sódio, 100 mM fluoreto de sódio, 10 mM pirofosfato de sódio e inibidor de protease). Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4 ° C para a remoção dos detritos. As concentrações de proteínas das amostras foram determinadas pelo método colorimétrico (*Bio Rad DC Protein Assay*). Alíquotas do lisado, contendo 20 µg de proteína total, foram misturadas com tampão de amostra para concentração final de 1x. Em seguida, foram fervidas por 5 minutos e aplicadas no gel. A separação das proteínas foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida 10 % a 4 °C, por 2 horas a 150 V. O padrão de peso molecular utilizado foi o *Prestained Protein Ladder – extra broad molecular weight* (Abcam). Após a corrida do gel, as proteínas foram eletrotransferidas para a membrana de nitrocelulose e foram bloqueadas com leite desnatado 5 % em TBST (0.13 M NaCl, 20 mM Tris, 0.1 % Tween 20, e pH 7,6) por 2 horas. Em seguida, a solução de bloqueio foi retirada e as membranas foram lavadas com TBST 6 vezes durante 5 minutos. Depois foram incubadas com anticorpo primário diluído em TBST com BSA 3% (albumina de soro bovino). Foram usados anticorpo de camundongo para eNOS (diluição 1: 1000, Abcam, número de catálogo ab76198), COX-2 (diluição 1: 1000, BD, número de catálogo 603203), gp91phox (diluição 1: 1000, Abcam, número de catálogo ab80897) e β-actina (diluição 1: 5000; Abcam, número de catálogo ab6276); anticorpo de coelho para COX-1 (diluição 1: 1000, Abcam, número de catálogo ab109025) e Akt (diluição 1: 1000, Abcam, número de catálogo ab8805). As membranas foram incubadas durante a noite a 4 ° C. Seguiram-se 6 lavagens de 5 minutos com TBST. Os

anticorpos secundários conjugados com peroxidase anti-camundongo (diluição 1: 2000, *Cell signaling*, número de catálogo 7076) ou anti-coelho (diluição 1: 2000, *Santa Cruz Biotechnology*, número de catálogo sc-2357) foram diluídos em BSA 1 % e aplicados à membrana por uma hora à temperatura ambiente. Depois foram realizadas outras 6 lavagens de 5 minutos. Em seguida, realizou-se a detecção de quimioluminescência utilizando-se o reagente luminol (*Santa Cruz Biotechnology*) seguida da exposição ao filme radiográfico. A quantificação das proteínas foi realizada por densitometria utilizando-se o software ImageJ (*National Institute of Health, NIH*). A expressão proteica foi calculada com base na proporção da densidade específica de cada banda proteica pela densidade correspondente da β-actina.

3.3.8. Produção de óxido nítrico (NO), ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em artérias coronárias

O protocolo para medida de NO foi realizado conforme Costa *et al.* (2018) e a avaliação da produção de $O_2^{\bullet -}$ e H_2O_2 foi realizada conforme Peixoto *et al.* (2018) com algumas modificações. Para os três grupos em estudo foi considerado um n=8 ratos, em total n=24 ratos.

Para avaliar a produção de NO foi utilizada a sonda fluorescente diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2, *Sigma-Aldrich*, 10 µM). As lâminas foram equilibradas por 10 minutos em tampão fosfato (0,1 mM, pH = 7,4) contendo $CaCl_2$ (0,45 mM). Em seguida, as secções foram incubadas com DAF-2 numa câmara úmida sob abrigo da luz, a 37 C°. Após 30 minutos de incubação, as secções de cada artéria foram estimuladas com tampão sem ACh (basal), contendo ACh (10 µM) ou fazendo uso de ACh + L-NAME (300 µM) por 10 minutos.

Para avaliar a produção de $O_2^{\bullet -}$ foi usada a sonda dihidroetídio (DHE; *Invitrogen*; 5 µM). As lâminas também foram equilibradas por 10 minutos em tampão fosfato e após 30 minutos de incubação com DHE as secções foram estimuladas com tampão sem ANG II (basal), contendo ANG II (1 µM) ou utilizando ANG II + Tiron (10 µM) por 10 minutos.

Para a quantificação de H_2O_2, utilizou-se a sonda 2',7' diclorodihidrofluoresceína-diacetato (H2DCF-DA; *Life Technologies*; 10 µM). As

lâminas também foram equilibradas por 10 minutos em tampão fosfato e incubadas com a sonda H2DCF-DA por 30 minutos. Após esse período as secções foram estimuladas com tampão sem ANG II (basal), contendo ANG II (1 µM) ou utilizando ANG II + catalase (1000 UI/mL) por 10 minutos.

Todas as lâminas foram lavadas 3 vezes com intervalo de 10 minutos, e montadas com auxílio do meio de montagem (*Santa Cruz Biotechnology, USA*) e de lamínulas. As imagens digitais foram adquiridas com um microscópio de fluorescência (*Zeiss, Axio Observer Z1*), equipado com filtro de fluoresceína e câmera *AxioCam MRm* usando uma objetiva de 40×. A intensidade de fluorescência foi medida usando o software de uso livre Image J (versão 1.46, *NHI*). A intensidade da fluorescência foi expressa em unidades arbitrárias.

3.3.9. Análise estatística

A análise dos dados foi realizada com auxílio do software estatístico GraphPad Prism 8. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM), ”n“ representa o número de animais estudados. Para identificar possíveis dados *outlier*, utilizamos o teste de *Grubbs*. Uma vez identificado *outlier*, foi utilizado o método de *ROUT* adaptado para detectar qualquer valor discrepante dos dados da coluna e esses foram removidos de acordo com a configuração Q em 1% (alfa = 0,01). Para cada conjunto de dados, o teste de normalidade de *D'Agostino-Pearson Omnibus* foi realizado. Para análise dos EDRFs da PPC basal foi usado o teste *t de student*. Para análises dos dados ponderais, PPC basal, *western blotting* e área sob a curva (AUC) foram realizadas usando a análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA). As análises da PAS, relaxamento do leito coronariano à BK e dos protocolos de bloqueios e as intensidades de fluorescência do NO, $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 foram realizadas usando a análise de variância de duas vias (*two-way* ANOVA). A AUC da resposta à BK foi calculada considerando a linha de base no nível 0 no eixo Y. Foi utilizado o pós-teste de *Tukey*, e o nível de significância foi estabelecido para valores de $p<0,05$.

4. RESULTADOS

Em relação a perda de animais, obtivemos um total 4 ratos mortos, sendo eles, 2 morreram na aferição da pressão arterial, 2 morreram após o procedimento cirúrgico de castração e nenhuma mortalidade durante o período de tratamento com veículo, testosterona e inibidor da aromatase.

4.1. DADOS PONDERAIS

A **tabela 1** mostra que a orquiectomia (ORX) e orquiectomia associada ao tratamento (ORX + T) não alterou o peso corporal e o comprimento da tíbia quando comparados ao grupo SHAM. Também, observamos uma redução do peso relativo da próstata e da vesícula seminal e aumento do peso relativo das glândulas adrenais e da pituitária no grupo ORX. Por outro lado, o tratamento preveniu, mas não aboliu a redução do peso relativo da próstata e vesícula seminal, bem como, preveniu parcialmente o aumento do peso relativo das glândulas adrenais e pituitária.

Tabela 1: Peso corpóreo (g), comprimento da tíbia (mm) e peso relativo (mg/mm) da próstata, vesícula seminal, glândulas adrenais e pituitária nos grupos SHAM, ORX e ORX + T após 15 dias de tratamento com doses fisiológicas de testosterona

Parâmetro	n	SHAM	n	ORX	n	ORX+T
Peso corporal (g)	22	226±6	20	209±7	20	215±5
Tíbia (mm)	22	35.24 ± 0.31	20	34.68 ± 0.31	20	34.99 ± 0.20
Próstata (mg/mm)	22	6.22 ± 0.34	20	**0.87 ± 0.21***	20	**3.38 ± 0.34*#**
Vesícula seminal (mg/mm)	22	15.43 ± 0.86	20	**2.68 ± 0.20***	20	**7.77 ± 0.61*#**
Glândula adrenal direita (mg/mm)	22	0.453 ± 0.012	20	**0.517 ± 0.014***	20	**0.442 ± 0.010#**
Glândula adrenal esquerda (mg/mm)	22	0.513 ± 0.017	20	**0.585 ± 0.017***	20	0.539 ± 0.010
Pituitária (mg/mm)	22	0.201 ± 0.005	20	**0.239 ± 0.003***	20	**0.216 ± 0.005*#**

Os valores foram expressos como a média ± EPM. ANOVA de uma via e pós-teste de *Tukey* foram utilizados. *p<0,05 *vs* grupo SHAM; #p<0,05 *vs* grupo ORX.

4.2. PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

A **figura 8** indica a progressão da PAS durante 15 dias, período no qual foi realizado o tratamento de reposição com testosterona. Ressaltamos neste momento, a importância da inclusão de um novo grupo (orquiectomia, reposição com testosterona conjugada com um inibidor da enzima aromatase - ORX+T+AI) com intuito de excluir a possibilidade de atuação do estradiol nas respostas, por meio da aromatização da testosterona. Sendo assim, observamos a progressão da PAS somente nos grupos SHAM, ORX + T e ORX + T + AI após 15 dias (205 ± 6 mmHg, 203 ± 4 mmHg, e 213 ± 3 mmHg respectivamente) em comparação ao primeiro dia de tratamento, dia 0 (181 ± 2 mmHg, 179 ± 3 mmHg, e 167 ± 2 mmHg, respectivamente). Entretanto, no grupo ORX não houve esta progressão (178 ± 2 mmHg para 187 ± 3 mmHg). Ao analisar diferenças entre grupos no 15ª dia, observamos que o grupo ORX apresentou o menor valor sistólico (187 ± 3 mmHg) em comparação aos demais grupos (SHAM: 205 ± 6 mmHg; ORX + T: 203 ± 4 mmHg; ORX + T + AI: 213 ± 3 mmHg).

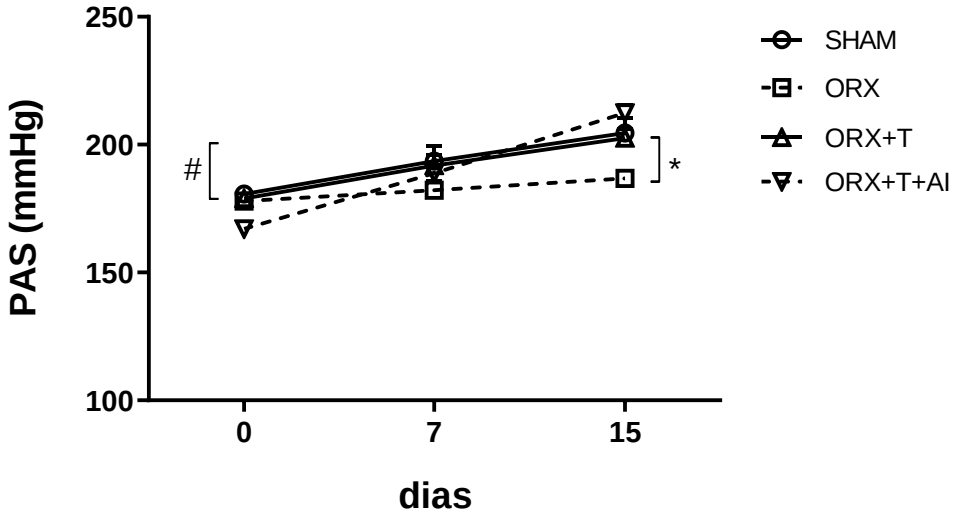

Figura 8. Pressão arterial sistólica (PAS) em SHR. SHAM (n = 13), ORX (n = 18), ORX + T (n = 22) e ORX + T + AI (n = 15). Os dados foram expressos como a média ± EPM. Análise de variância de duas vias e pós-teste de *Tukey* foram utilizados para análise dos dados. #p<0.05 dia 0 *vs* dia 15,*p<0.05 *vs* SHAM.

4.3. PRESSÃO DE PERFUSÃO CORONARIANA BASAL

De acordo com a **figura 9**, não observamos diferenças entre os grupos na pressão de perfusão coronariana basal ao final do tratamento (SHAM, 116 ± 8 mm Hg; ORX, 114 ± 6 mm Hg; ORX + T, 110 ± 4 mm Hg; ORX + T + AI, 95 ± 3 mm Hg).

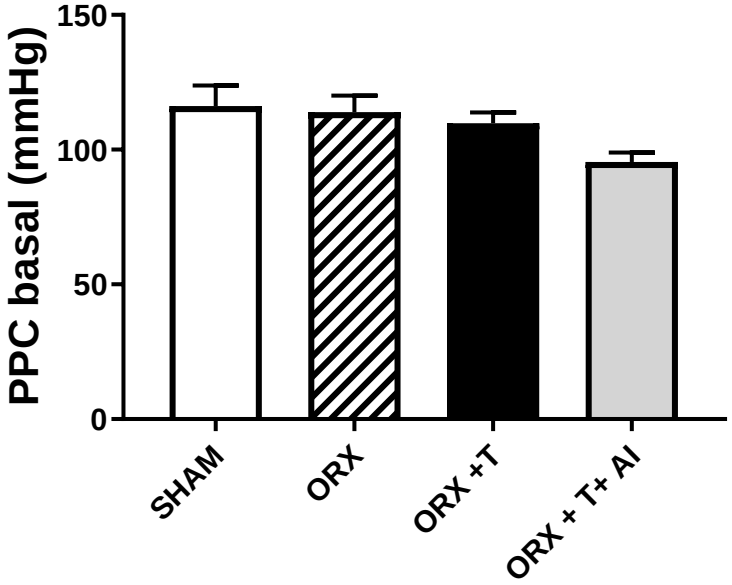

Figura 9. Pressão de perfusão coronariana (PPC) basal nos grupos SHAM (n = 12), ORX (n = 10), ORX +T (n = 9) e ORX + T+ AI (n = 8). Os dados foram expressos como a média ± EPM, foram utilizados a análise de variância de uma via seguida pelo pós-teste de *Tukey*.

4.4. PAPEL DOS EDRFS NA MANUTENÇÃO DA PRESSÃO DE PERFUSÃO CORONARIANA BASAL.

Os resultados provenientes da **tabela 2**, indicam a participação dos mediadores endoteliais na manutenção do tônus coronariano. Sendo assim, os dados mostram o importante papel do NO e da via dos prostanóides nesta manutenção. Por outro lado, não observamos diferenças entre os bloqueios conjugados (L-NAME+INDO, L-NAME+INDO+CLOT e L-NAME+INDO+TBA) revelando assim, que a EDH, via EETs e/ou canais para K^+, parece não participar na manutenção do tônus coronariano.

Tabela 2. Delta de variação percentual (%) da PPC nos grupos SHAM, ORX e ORX + T após a perfusão com 100 µM de L-NAME; 2,8 µM de indometacina (INDO); L-NAME + INDO; L-NAME + INDO + 0,75 µM de clotrimazol (CLOT) ou L- NAME + INDO + 0,75 mM de Tetrabutilamônio (TBA).

Tratamento	CONTROLE		L-NAME		INDO		L-NAME + INDO		L-NAME + INDO + CLOT		L-NAME + INDO + TBA	
	n	mmHg	n	Δ (%)	n	Δ (%)	n	Δ (%)	n	Δ (%)	n	Δ (%)
SHAM	8	114±7	8	**71 ± 15***	8	**22 ± 3***	8	54 ± 12*	8	67 ± 16*	8	74 ± 8*
ORX	8	114±6	8	**84 ± 14***	8	**46 ± 16***	8	85 ± 19*	8	83 ± 13*	8	78 ± 11*
ORX+T	8	116±5	8	**76 ± 12***	8	**35 ± 9***	8	79 ± 11*	8	77 ± 7*	8	83 ± 10*

Os valores foram expressos como a média ± EPM. Para a comparação de dos grupos foram usados o teste *t de student.* *p<0,05 em comparação ao controle.

4.5. REATIVIDADE DO LEITO VASCULAR CORONARIANO EM RESPOSTA À BRADICININA

Na **figura 10A** observamos as curvas dose-resposta à BK. Os grupos ORX + T e ORX + T + AI apresentaram um aumento significativo na resposta relaxante à BK em comparação ao grupo SHAM, e isso foi evidente a partir das doses de $3x10^{-8}$ a 10^{-6} M. A **figura 10B** mostra a área sob a curva (AUC) da resposta relaxante à BK. As AUCs dos grupos ORX + T e ORX + T + AI foram maiores em comparação ao grupo SHAM. Por outro lado, não houve diferença das AUCs entre os grupos ORX + T e ORX + T + AI. Além disso, a AUC do grupo ORX + T + AI foi maior da AUC do grupo ORX.

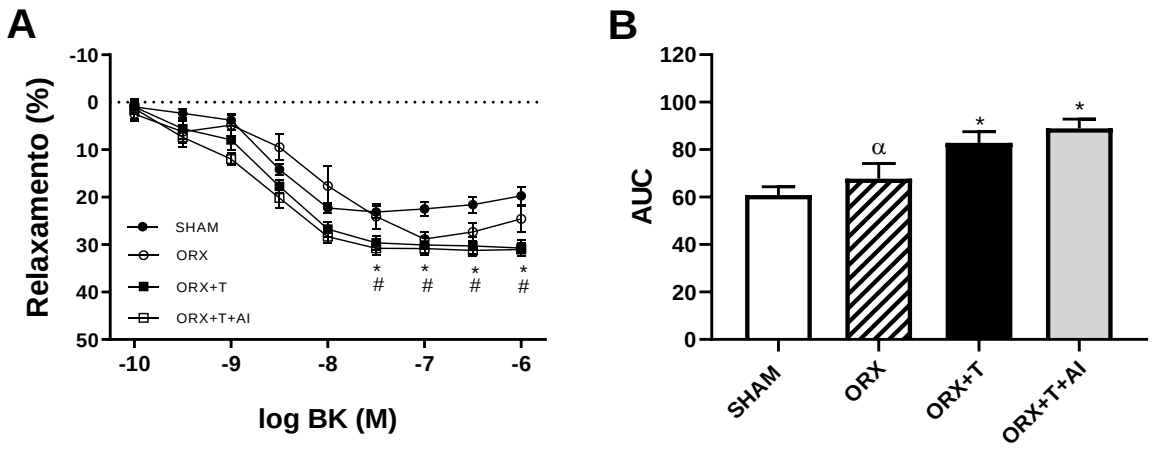

Figura 10. A) Curvas dose-resposta à bradicinina (BK,10^{-10} a 10^{-6} M) no leito vascular coronariano dos grupos SHAM (n = 12), ORX (n = 10), ORX + T (n = 9) e ORX + T + AI (n = 8). Os dados foram expressos como média ± EPM. A análise de variância de duas vias e pós-teste de *Tukey* foram utilizados. *p<0,05 ORX + T *vs* SHAM; $^{\#}$p<0,05 ORX + T + AI *vs* SHAM. **B)** Área sob a curva (AUC, em unidades arbitrárias) após administração da BK em todos os grupos. Os dados foram expressos como média ± EPM. A análise de variância de uma via e pós-teste de *Tukey* foram utilizados *p<0,05 *vs* SHAM; $^{\alpha}$p<0,05 *vs* ORX + T + AI.

4.6. MEDIADORES ENDOTELIAIS NO RELAXAMENTO DO LEITO VASCULAR CORONARIANO

Ao analisarmos quais mediadores endoteliais participam na resposta de relaxamento induzido pela BK, observamos que esta reposta é, em parte, dependente do NO, da via dos prostanóides e da EDH. Adicionalmente, quando analisada uma das vias candidatas à EDH, a via da CYP, observamos que o relaxamento à BK foi abolido, bem como, após a utilização de um bloqueador inespecífico de canais para potássio nos grupos SHAM e ORX (**figura 11A e B**).

Por outro lado, foi observado que no grupo tratado com testosterona a via dos prostanóides parece não participar no relaxamento induzido pela BK, ao passo que tanto o NO quanto a EDH participam desta resposta. Similarmente aos grupos SHAM e ORX, a inibição tanto da CYP quanto dos canais para potássio aboliram o relaxamento à BK (**figura 11C**).

A **figura 12**, mostra que a síntese de NO não foi diferente entre os grupos. A participação da prostaciclina foi reduzida no grupo tratado com testosterona. Além disso, o grupo tratado com testosterona teve maior participação da EDH (EETs e os canais para potássio) no relaxamento à BK.

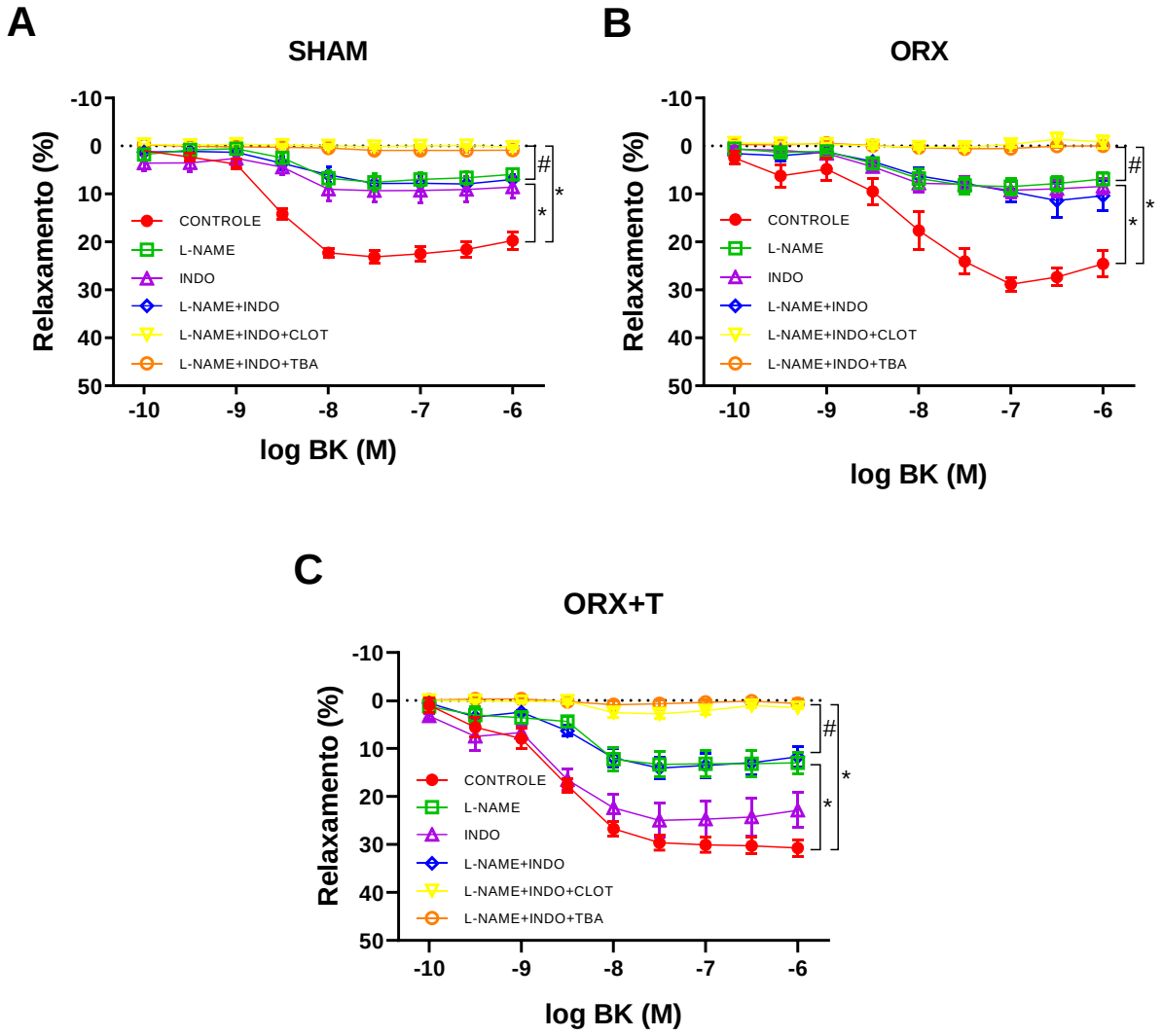

Figura 11. Curvas dose-resposta à bradicinina (BK, 10^{-10} a 10^{-6} M) no leito vascular coronariano dos grupos SHAM (**A**), ORX (**B**) e ORX + T (**C**) antes e após perfusão com L-NAME 100 µM; Indometacina 2,8 µM (INDO); L-NAME + INDO; L-NAME + INDO + Clotrimazol 0,75 µM (CLOT) ou L-NAME + INDO + Tetrabutilamônio 0,75 mM (TBA). Os dados foram expressos como média ± EPM. Utilizamos a análise de variância de duas vias seguida pelo pós-teste de *Tukey*. $^{*}p<0,05$ *vs* controle; $^{\#}p<0,05$ *vs* L-NAME + INDO, n=8.

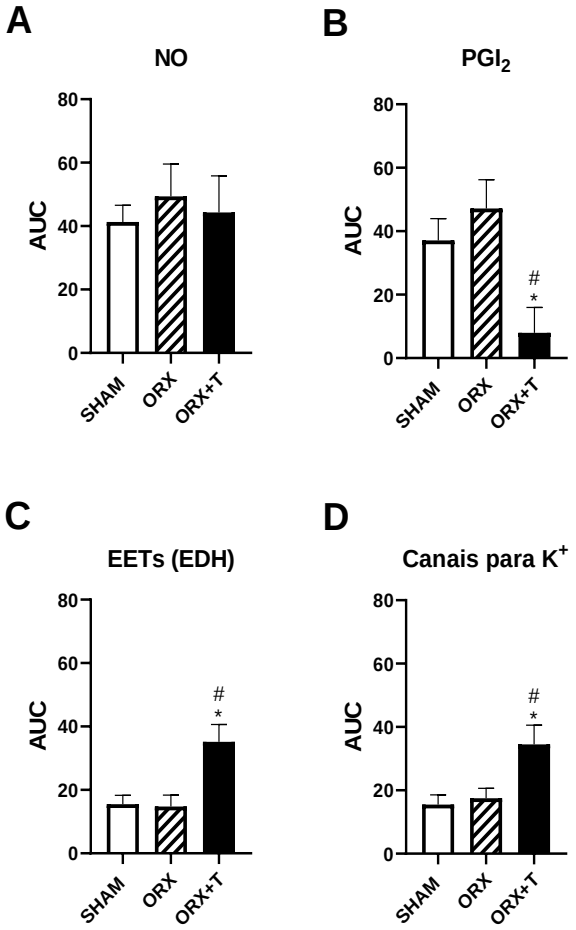

Figura 12. Participação dos fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs) no relaxamento induzido pela BK no leito vascular coronariano dos grupos SHAM (n = 8), ORX (n = 8) e ORX + T (n = 8). A participação dos EDRFs foi calculada por meio das diferenças entre as áreas sob as curvas com os inibidores: oxido nítrico (NO) = [AUC (Controle) - AUC (L-NAME)] (**A**), prostaclina (PGI_2) = [AUC (Controle) - AUC (INDO)] (**B**), ácidos epoxieicosatrienoicos-EETs (EDH) = [AUC (L-NAME + INDO) - AUC (L-NAME + INDO + CLOT)] (**C**) e dos canais para potássio (canais para K^+) = [AUC (L-NAME + INDO) - AUC (L-NAME + INDO + TBA)] (**D**). Os dados foram expressos como média ± EPM. Utilizamos análise de variância de uma via seguida pelo pós-teste de *Tukey*. $^*p<0,05$ *vs* SHAM; $^\#p<0,05$ *vs* ORX.

4.7. EXPRESSÃO PROTEICA DA eNOS, COX-1, COX-2, gp91phox E Akt EM ARTÉRIAS CORONÁRIAS

De acordo com a **figura 13**, observamos que nem a orquiectomia nem o tratamento com testosterona alterou a expressão da eNOS, COX-1, COX-2 e gp91phox nas coronárias dos grupos estudados. No entanto, a orquiectomia aumentou a expressão apenas da Akt e o tratamento com testosterona não evitou esse efeito.

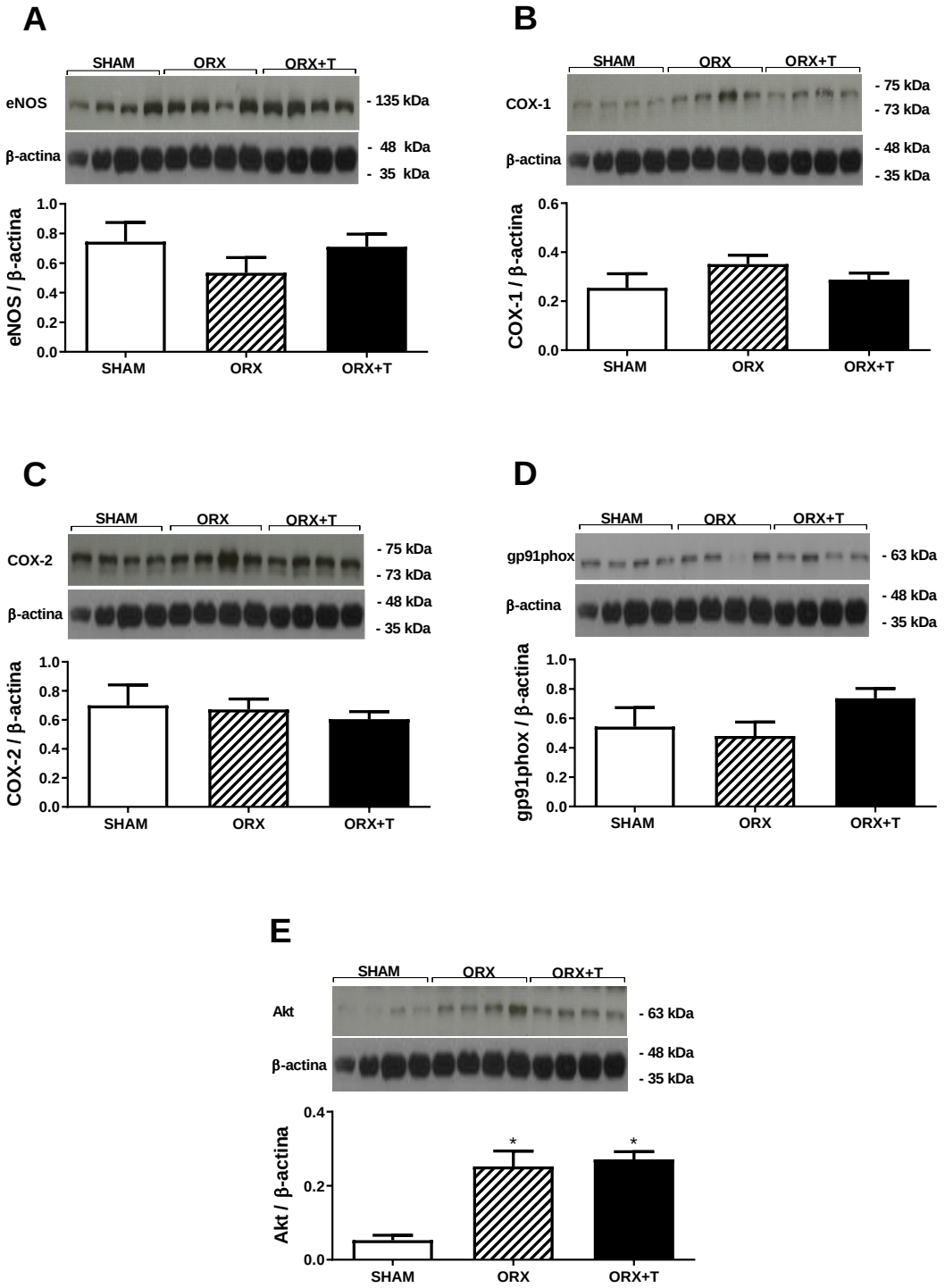

Figura 13. *Western blotting* e análise densidométrica da expressão da eNOS, COX-1, COX-2, gp91phox e Akt nas artérias coronárias nos grupos SHAM, ORX e ORX + T. Na parte superior de cada figura, o exemplo representativo do *blotting* da eNOS (**A**), COX-1 (**B**), COX-2 (**C**), gp91phox (**D**) e Akt (**E**). Na parte inferior de cada figura mostra, a análise densidométrica da expressão de cada proteína. Os resultados (média ± EPM) foram expressos como a relação entre o sinal da proteína em estudo e o sinal da β-actina. Foram utilizados a análise de variância de uma via e pós-teste de *Tukey* para a análise dos dados, n = 4 animais por grupo.

4.8. PRODUÇÃO DE NO EM ARTÉRIAS CORONÁRIAS

As análises de fluorescência indicaram que não houve diferença entre os grupos estudados em relação a síntese de NO em condições basais. Adicionalmente, ao realizar o mesmo protocolo perante estimulação para formação de NO, houve um aumento nesta produção, no entanto também não observamos diferenças entre os grupos estudados (**figura 14**).

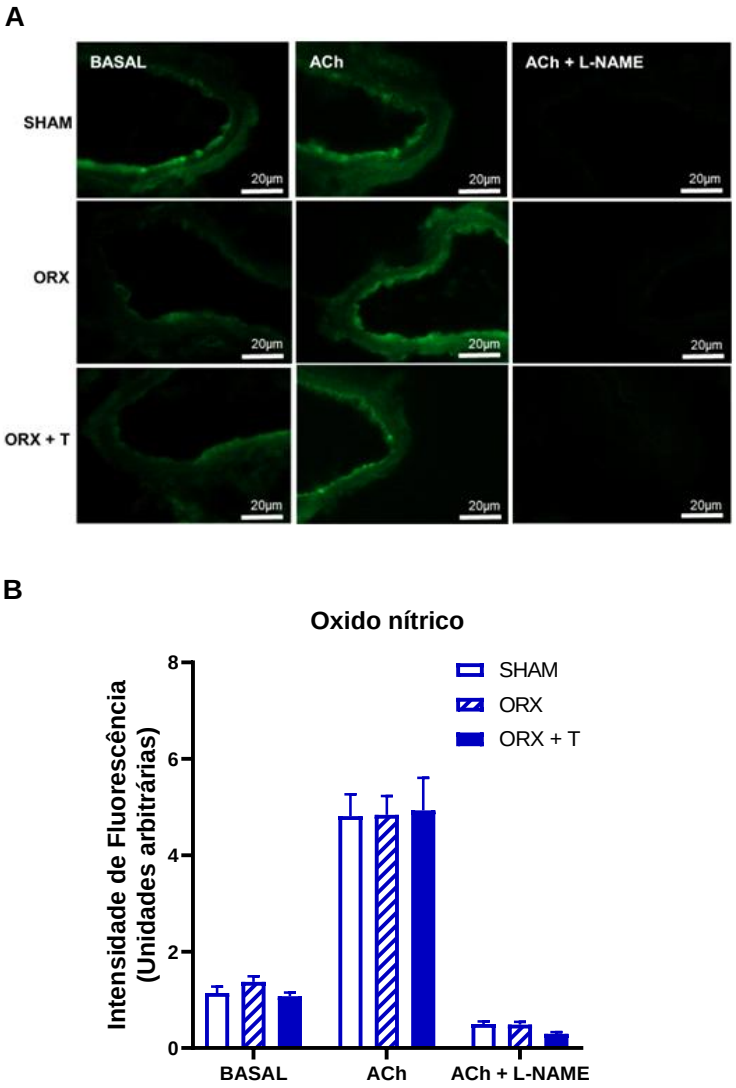

Figura 14. Detecção espectrofluorométrica de oxido nítrico (NO) com DAF-2 em cortes transversais de artérias coronárias no estado basal, quando incubadas com acetilcolina (ACh) ou com ACh + L-NAME dos grupos SHAM, ORX e ORX + T. As imagens de fluorescência são representativas de 8 ratos para cada grupo (**A**). O gráfico de barras mostra a média ± EPM da intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias. A análise de variância de duas vias e pós-teste de *Tukey* foram utilizadas para a análise dos dados, com *p<0,05 (**B**).

4.9. PRODUÇÃO DE $O_2^{\bullet-}$ EM ARTÉRIAS CORONÁRIAS

De acordo com os dados da fluorescência ao DHE, observamos que o tratamento com testosterona foi capaz de aumentar a síntese de $O_2^{\bullet-}$ em comparação ao grupo SHAM e ORX em condições basais e após a estimulação com ANG II (**Figura 15**).

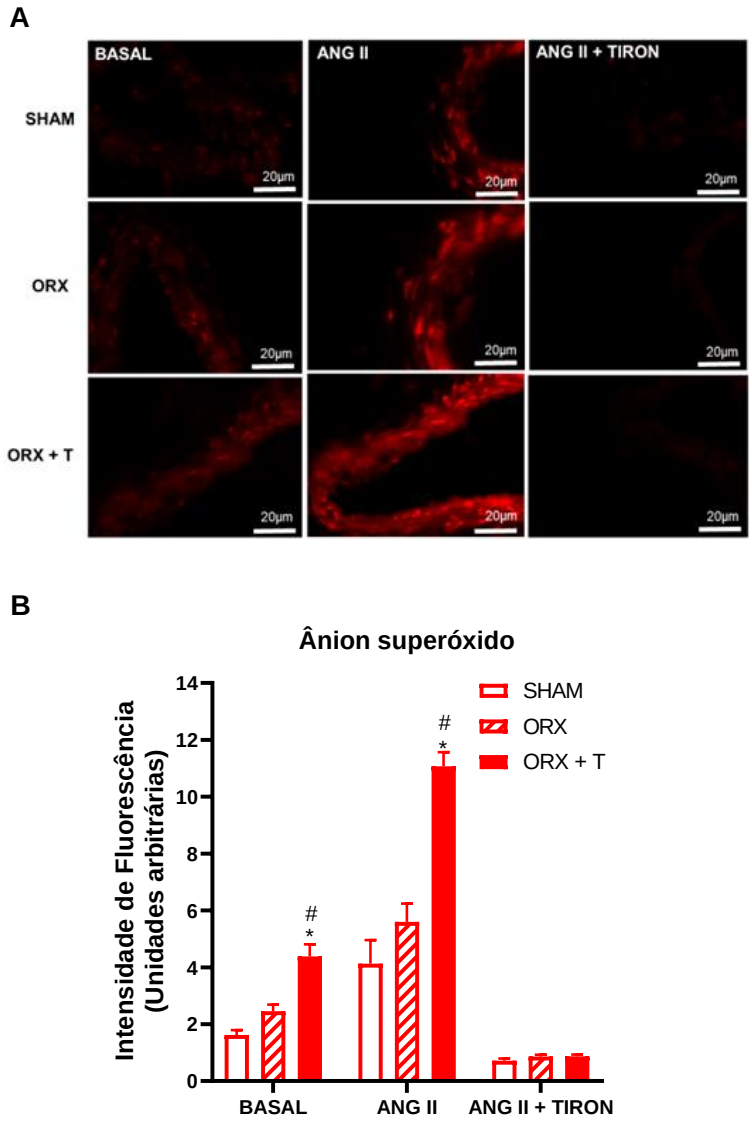

Figura 15. Detecção espectrofluorométrica do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pelo DHE em cortes transversais de artérias coronárias no estado basal, quando incubadas com ANG II ou ANG II + Tiron dos grupos SHAM, ORX e ORX + T. As imagens de fluorescência são representativas de 8 ratos para cada grupo (**A**). O gráfico de barras mostra a média ± EPM da intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias. A análise de variância de duas vias e pós-teste de *Tukey* foram utilizadas para a análise dos dados, com*$p<0,05$ (**B**).

4.10. PRODUÇÃO DE H_2O_2 EM ARTÉRIAS CORONÁRIAS

De acordo com os dados da fluorescência ao DCF-DA, observamos que o tratamento com testosterona também foi capaz de aumentar a síntese de H_2O_2 em comparação ao grupo SHAM e ORX em condições basais e após a estimulação com ANG II (**figura 16**).

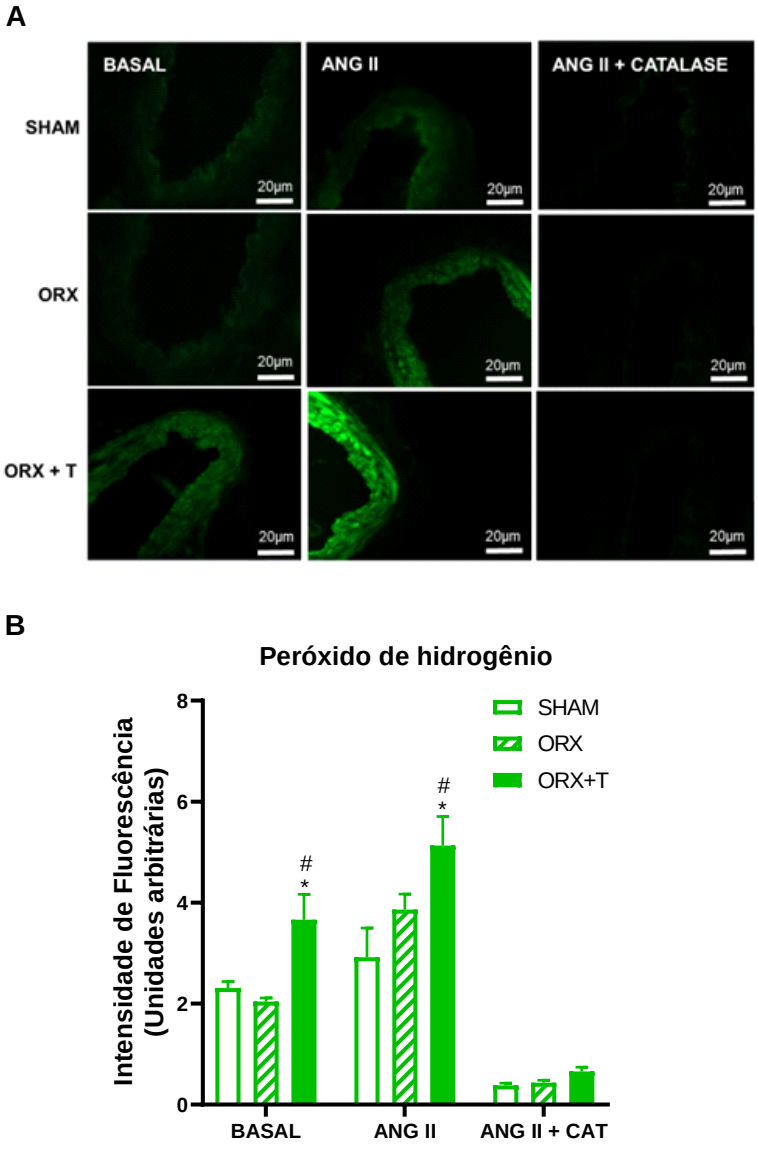

Figura 16. Detecção espectrofluorométrica de peroxido de hidrogênio (H_2O_2) com DCF-DA em cortes transversais de artérias coronárias no estado basal, quando incubadas com ANG II ou ANG II + catalase nos grupos SHAM, ORX e ORX + T. As imagens de fluorescência são representativas de 8 ratos para cada grupo (**A**). O gráfico de barras mostra a média ± EPM da intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias. A análise de variância de duas vias e pós-teste de *Tukey* foram utilizadas para a análise dos dados, com *p<0,05 (**B**).

5. DISCUSSÃO

O achado principal deste estudo, foi que a terapia de reposição com doses fisiológicas de testosterona por 15 dias, aumentou o relaxamento induzido pela BK no leito vascular coronariano em SHR orquiectomizado, resposta que foi independente da aromatização, com maior participação da EDH. Um dos possíveis candidatos para a EDH são os EETs (que agiriam estimulando os canais para potássio) e o H_2O_2.

Iniciamos a discussão do presente estudo confirmando indiretamente nosso modelo de deficiência hormonal, para a qual avaliamos o peso corpóreo e o peso relativo da próstata, vesícula seminal, glândulas adrenais e pituitária após orquiectomia e a terapia de reposição com doses fisiológicas de testosterona. Nossos resultados mostraram que o peso corpóreo dos ratos não foi alterado nos grupos estudados. A orquiectomia diminuiu o peso relativo da próstata quanto da vesícula seminal, e a terapia de reposição com doses fisiológicas de testosterona preveniu parcialmente essa diminuição. Estes resultados sugerem o papel importante da testosterona na função e/ou trofismo desses órgãos (Bingaman *et al.* 1994; Handa *et al.* 1994), isto poderia confirmar indiretamente nosso modelo de deficiência hormonal induzido pela orquiectomia em SHR. Por outro lado, nossos resultados mostraram que a orquiectomia aumentou o peso relativo das glândulas adrenais além da glândula pituitária e o tratamento preveniu parcialmente esse aumento. Similarmente, Kitay (1963) demonstrou que a orquiectomia em ratos produziu aumento do peso da glândula pituitária e adrenais, e que a terapia de reposição com testosterona reverteu esses efeitos. Também , observou-se que a orquiectomia ativa o eixo Hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA), e que o tratamento com testosterona reverte esse efeito (Bingaman *et al.* 1994; Handa *et al.* 1994, 2013; Rubinow *et al.* 2005; Williamson *et al.* 2005). Portanto, este aumento do peso relativo das glândulas adrenais e da pituitária no grupo orquiectomizado refletiriam numa atividade aumentada destas glândulas, além do papel importante da testosterona no controle do eixo HPA.

Em relação ao estudo do papel da testosterona no desenvolvimento da hipertensão em SHR por meio da orquiectomia e tratamento com doses fisiológicas de testosterona por 15 dias sobre a PA. Nossos dados mostraram, que a orquiectomia foi capaz de reduzir os valores pressóricos e a reposição com testosterona impediu esta redução. Estes resultados corroboram os achados de Masubuchi *et al.* (1982),

Jenkins *et al.* (1994), e Song e Martin (2006) que demostraram o papel da testosterona na manutenção da pressão arterial em animais hipertensos. Ademais, Reckelhoff *et al.* (1999) demonstraram que o tratamento com flutamida (antagonista do AR) diminuiu a PA em SHR. Por conseguinte, já foi proposto que a hipertensão em SHR seria mediada pela testosterona por meio da ativação do SRAA (Reckelhoff *et al.* 2000b; Fischer *et al.* 2002) aumentando o estresse oxidativo (Fortepiani & Reckelhoff 2005) e a ativação do tônus simpático periférico (Salt 1972).

Os resultados da PPC basal nos sugerem que a testosterona não participa do controle do tônus vascular coronariano. Estes dados são similares aos achados de outros trabalhos realizados em nosso laboratório em ratos normotensos (Moysés *et al.* 2001; Rouver *et al.* 2015). A manutenção basal do tônus do leito vascular coronariano depende de fatores sintetizados pelo endotélio, em resposta aos estímulos fisiológicos, e a participação desses fatores estaria relacionada com uma regulação homeostática da função vascular (Santos *et al.* 2010). Analisando especificamente a participação dos EDRFs no controle da PPC basal, nossos resultados sugerem semelhante participação do NO e prostanóides vasodilatadores na modulação da PPC basal em todos os grupos. Estes resultados parcialmente corroboram os achados de Santos *et al*. (2010)que sugeriram a participação do NO, PGI_2 e EDH no controle da PPC basal em SHR intacto. Outros estudos realizados em ratos normotensos intactos ou orquiectomizados sugeriram a participação do NO (Fulton *et al.* 1995, 1996; Rouver *et al.* 2015; Santos *et al.* 2016), ou NO e PGI_2 (Santos *et al.* 2004, 2016; Rouver *et al.* 2015) no controle da PPC basal, bem como na manutenção do tônus em animais orquiectomizados tratados com testosterona (Rouver *et al.* 2015).

Após obtido os dados da PPC basal, analisamos a reatividade vascular coronariana utilizando como agonista vasodilatador à BK. Observamos que o tratamento com testosterona por 15 dias potencializou a resposta de relaxamento induzida pela BK em SHR orquiectomizado, e esse efeito foi independente da aromatização. Resultados similares foram encontrados por Rouver *et al.* (2015) em ratos normotensos e orquiectomizados, sugerindo assim, que a terapia de reposição com doses fisiológicas de testosterona modula positivamente a função endotelial. Esta melhora do relaxamento à BK, talvez possa ser atribuída à modulação pela testosterona exógena em ausência dos outros hormônios testiculares. Assim, o

testículo, além da testosterona e DHT, sintetiza pregnenolona, dehidroepiandrosterona (DHEA), progesterona e as formas sulfatadas destes hormônios (Torre *et al.* 1986), que podem contribuir para o aumento do tônus vascular (Payne & Jaffe 1975; Souness & Morris 1996; Luisi *et al.* 2000; Charalampopoulos *et al.* 2005; Chang *et al.* 2008; Figueroa-Valverde *et al.* 2009, 2010). Por outro lado, a testosterona inibe a síntese basal da aldosterona, também a estimulada pela ANG II e pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (Kau *et al.* 1999) modulando o tônus vascular. Portanto, esses efeitos da testosterona exógena em ausência dos outros hormônios testiculares parecem modular o ambiente vascular e contribuir para maior relaxamento à BK no leito vascular coronariano de SHR orquiectomizado.

Em relação aos mediadores endoteliais envolvidos nesta resposta, nossos resultados sugerem participação do NO, via dos prostanóides e da EDH no relaxamento induzido pela BK nos grupos SHAM e ORX. Em ambos os grupos, a participação de NO parece ser de forma independente da via dos prostanóides, igualmente há uma independência da participação dos prostanóides em relação ao NO, já que a inibição da síntese de ambos os mediadores, não alterou o relaxamento à BK quando comparado com a inibição individual da síntese de cada mediador, ou seja, a inibição da síntese de NO e PGI_2 não teve nenhum efeito antagônico ou sinérgico num provável cross-talk entre eNOS e COX (Upmacis *et al.* 1999; Kim *et al.* 2005). Por outro lado, no grupo tratado houve a participação somente do NO e EDH nesta resposta. Além disso, a participação do NO se manteve no relaxamento à BK após a inibição da síntese de NO e prostanóides, o que sugere uma atividade da eNOS independente dos efeitos da COX, em termos da possível existência de um *cross-talk* entre eNOS e COX (Upmacis *et al.* 1999; Kim *et al.* 2005).

A ausência da alteração do relaxamento à BK, após perfusão com indometacina no grupo tratado, nos leva a sugerir que o tratamento com testosterona em ausência de outros hormônios testiculares modula negativamente a participação dos prostanóides. De fato, estudos demonstram que a testosterona possui a capacidade de modular essa via ao promover uma redução na síntese da PGI_2 e TXA_2 em artéria cerebral de ratos (Gonzales *et al.* 2004) ou somente PGI_2 em cultura de células de músculo liso de aorta de rato (Nakao *et al.* 1981). Por outro lado, Schror *et al.* (1994) mostraram um aumento na densidade do receptor de TXA_2 em coronária de

cobaia, após tratamento com testosterona. Sendo assim, parece que os efeitos da testosterona são amplos e dependem de algumas condições fisiológicas.

Para avaliar a participação da EDH no relaxamento induzido pela BK, a inibição da síntese do NO e a via dos prostanóides são fundamentais (Campbell & Harder 2001). Um dos possíveis candidatos à EDH, são os metabólitos da CYP [ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs)](Baron *et al.* 1997; Popp *et al.* 2002). O clotrimazol é um inibidor não seletivo da CYP (Fulton *et al.* 1995) que utilizamos para estudar a participação dos seus metabólitos. Assim, após perfusão com clotrimazol em presença dos inibidores da NOS e COX, o relaxamento foi quase abolido nos grupos estudados em comparação às curvas controles. Além disso, o relaxamento após a perfusão com L-NAME + INDO em comparação com L-NAME + INDO + CLOT foram diferentes. Isso sugere a participação dos metabólitos da CYP (EETs) na EDH. Nossos resultados corroboram estudos prévios no leito vascular coronariano de ratos normotensos orquiectomizados e tratados com doses fisiológicas de testosterona (Rouver *et al.* 2015), em artéria coronária de rato normotenso intacto (Fulton *et al.* 1995) e em artéria coronária de porco intacto (Fisslthaler *et al.* 1999). No entanto, em nosso estudo a participação dos metabólitos da CYP (EETs) aumentou no grupo tratado com testosterona, sugerindo uma provável modulação da expressão e/ou atividade da CYP, além da provável modulação da síntese e/ou função dos metabólitos da CYP pela testosterona exógena em ausência dos outros hormônios testiculares no leito vascular coronariano.

Elementos importantes da EDH são os canais para potássio. Sendo assim, para estudá-los, realizamos um protocolo de bloqueio inespecífico com TBA e observamos que o relaxamento à BK foi abolido em todos os grupos. Além disso, o relaxamento após a perfusão com L-NAME + INDO + TBA foi diferente daquela somente com L-NAME + INDO, o que sugere envolvimento dos canais para potássio no relaxamento do leito vascular coronariano. Não obstante, observamos que a participação dos canais para potássio foi maior no grupo tratado em comparação com os grupos SHAM e ORX. Similarmente, outros estudos mostraram que a expressão dos canais para potássio em aorta de rato (Zhou *et al.* 2008) e em tecido cardíaco (Liu *et al.* 2003; Brouillette *et al.* 2005; Kurokawa *et al.* 2016; Masuda *et al.* 2018) é regulada pela testosterona, isso sugere a possível modulação pela testosterona exógena em ausência dos outros hormônios testiculares na expressão e atividade dos canais para

potássio no leito vascular coronariano. Baseado em nossos resultados, sugerimos que a participação dos canais para potássio parece ser mediada pelos EETs (via EDH) (Hu & Kim 1993; Li & Campbell 1997; Gauthier *et al.* 2005; Larsen *et al.* 2006) ou o envolvimento de possíveis candidatos à EDH, tais como H_2O_2, já que os nossos resultados de fluorescência com DCF-DA mostraram um aumento na sua síntese no grupo tratado com testosterona. De fato, um dos candidatos à EDH é o H_2O_2 sintetizado a partir da dismutação do $O_2^{\bullet -}$ pela enzima Cu,Zn superóxido dismutase (Cu, Zn-SOD), portanto a sua formação depende das concentrações de $O_2^{\bullet -}$ que pode ser formado a partir da eNOS desacoplada (Matoba *et al.* 2000, 2002; Matoba & Shimokawa 2003; Morikawa *et al.* 2003; Shimokawa & Matoba 2004; Takaki *et al.* 2008; Shimokawa 2010). Como nossos dados mostraram que a formação do NO foi similar entre os grupos, a síntese aumentada de $O_2^{\bullet -}$, tal como sugerido pela da análise de DHE, não seria produto da eNOS desacoplada. Talvez, uma fonte adicional na síntese de $O_2^{\bullet -}$ seja a ativação aumentada da CYP epoxigenase, enzima envolvida também na síntese de EETs (maior no grupo ORX + T) e consequentemente, maior geração de H_2O_2 no grupo tratado do presente trabalho. Portanto, há uma provável atuação do H_2O_2 sobre os canais para potássio (Barlow & White 1998; Hayabuchi *et al.* 1998), no musculo liso vascular do leito coronariano. Para comprovar esta suposição, precisaríamos de um protocolo com a degradação da síntese de H_2O_2, por exemplo, a perfusão do leito vascular coronariano com catalase.

De fato, a EDH participa da resposta de relaxamento induzida pela BK em todos os grupos, porém, no grupo tratado esta participação se encontra potencializada. Para explicar este resultado, primeiramente poderíamos especular um possível *cross-talk* entre a via dos prostanóides e atividade da EDH em SHR, ou seja, a via dos prostanóides inibindo a via da EDH. Esta hipótese está baseada nos estudos de Plane e Garland (1996) que demonstraram um relaxamento induzido à ACh mediado pelo NO e EDH após uma pré-contração com fenilefrina, por outro lado, quando houve uma pré-contração com U46619, um agonista do receptor de TXA_2, o relaxamento foi mediado somente pelo NO. Reforçando ainda mais esta idéia, o estudo de Scornik e Toro (1992) demonstrou que o U46619 inibiu a probabilidade de abertura dos canais para potássio, em artéria coronária de porco. Portanto, estes estudos nos dá um embasamento para explicar a predominância da via da EDH em nossos resultados no grupo tratado (Scornik & Toro 1992; Plane & Garland 1996; Crane & Garland 2004)

em associação com a via dos prostanóides que se encontra reduzida devido à testosterona exógena em ausência dos outros hormônios testiculares, justificando assim, a resposta aumentada da EDH no grupo tratado.

Para nos ajudar a discutir os resultados relacionados a participação dos EDRFs no relaxamento induzido pela BK, fizemos análises na expressão proteica de diferentes enzimas envolvidas na síntese deste principais mediadores (eNOS, COX-1 e COX-2), além da gp91phox, subunidade catalítica produtora de $O_2^{\bullet -}$ e a proteína quinase B (Akt), proteína envolvida na sinalização intracelular.

Em relação à expressão da enzima envolvida na síntese de NO, nossos resultados mostraram que a expressão da eNOS na coronária não foi diferente nos grupos estudados, sugerindo que a testosterona não modula a expressão da eNOS. Similarmente, em tecido vascular de ratos normotensos Blanco-Rivero *et al.* (2006a, b, 2007) mostraram que a orquiectomia não alterou a expressão da eNOS, em artéria mesentérica e aorta. Além disso, Martin *et al.* (2005) mostraram que a orquiectomia reduziu a expressão da nNOS, em artéria mesentérica. Em outros tecidos, Penson *et al.* (1996) mostraram, que nem a orquiectomia nem o tratamento anti-androgênico (com flutamida), alteraram a expressão da eNOS e nNOS em fracção citosólica do pênis do rato. Por outro lado, Park *et al.* (2001) mostraram, que em corpo cavernoso do pênis do rato, a orquiectomia diminuiu a expressão da nNOS, e foi restaurada pela terapia de substituição com androgênios (testosterona e DHT); e a expressão da eNOS, não foi alterada por nenhum tratamento. Provavelmente, a modulação da expressão da NOS pelos andrógenos dependa de alguns fatores, tais como a isoforma da NOS, o tecido em análise, se há alguma doença instalada e a espécie estudada. Assim, poderíamos afirmar que tanto a expressão quanto a atividade da eNOS na coronária seriam independentes dos efeitos da testosterona e provavelmente dos outros hormônios testiculares no SHR, visto que além de não modificar a eNOS, nossos resultados de fluorescência com DAF-2 indicaram que a produção de NO basal e após estimulação com ACh não foi diferente entre os grupos estudados.

Em relação à expressão das enzimas que sintetizam os prostanóides, a expressão da COX-1 e COX-2 em artérias coronárias não foi diferente nos grupos estudados. Similarmente, Blanco-Rivero *et al.* (2006a) mostraram que a orquiectomia não alterou a expressão da COX-2 em artéria mesentérica de ratos. Por outro lado,

Martorell *et al.* (2007) mostraram que a orquiectomia aumentou a expressão da COX-2 em aorta. Cheuk *et al.* (2000) mostraram que a orquiectomia diminuiu a expressão da COX-1 e COX-2 no epidídimo e o tratamento com testosterona reverteu esta resposta. Portanto, embora a participação da via dos prostanóides tenha sido similar entre os grupos SHAM e orquiectomizado no relaxamento induzido pela BK, esperávamos uma redução na expressão da COX no grupo tratado, uma vez que esta via se encontra atenuada neste grupo. No entanto, mesmo sem diferenças na expressão proteica, isso não significa necessariamente que a atividade destas enzimas está reduzida. Pode significar também, uma redução na síntese de PGI_2 e uma maior produção na síntese de TXA_2.

Sabe-se que os EETs modulam a atividade da Akt, em mecanismos envolvidos com a proliferação celular endotelial, angiogênese e entre outras funções (Pozzi *et al.* 2005; Wang *et al.* 2005). Devido à participação aumentada dos EETs, no relaxamento induzido pela BK no grupo tratado com testosterona, analisamos de que forma a expressão da Akt interferiria nesse relaxamento. Assim, nossos resultados mostraram, que a orquiectomia aumentou a expressão da Akt, e o tratamento não impediu esse efeito. Inicialmente isto sugere, que a testosterona exógena não modularia a expressão da Akt. Uma hipótese para explicar tais resultados estaria relacionada à modulação na expressão da Akt por outros hormônios testiculares, como por exemplo, pregnenolona, sulfato de pregnenolona, progesterona, DHEA e sulfato de DHEA (Torre *et al.* 1986) e não diretamente pela testosterona. Não obstante, estudos têm indicado resultados contrários aos nossos, como o de Zhao *et al.* (2016) em aorta de ratos normotensos onde a orquiectomia diminuiu a expressão da Akt, e que a reposição com dose baixa de testosterona reverteu parcialmente esse efeito.

Embora a expressão da Akt tenha aumentado nos grupos ORX e ORX + T, parece que este aumento não contribui com o mecanismo de fosforilação da eNOS (Fulton *et al.* 1999; Luo *et al.* 2000) já que a síntese basal de NO e após estimulação com ACh, além de que sua participação no relaxamento induzido pela BK foi similar entre os grupos estudados. Talvez a expressão aumentada da Akt em ausência dos outros hormônios testiculares, possa ter contribuído com a modulação dos outros mecanismos intracelulares, como a migração celular e angiogênese (Michell *et al.* 1999; Kawasaki *et al.* 2003), contribuindo com uma mudança para um ambiente

vascular saudável, e que indiretamente possa ter participado do relaxamento aumentado à BK no leito vascular coronariano no grupo tratado.

Ao analisarmos a expressão da gp91phox (subunidade da NOX2) nossos resultados mostraram que não houve diferenças entre os grupos, ou seja, a testosterona e os outros hormônios testiculares não modulariam a expressão da NOX2. No entanto, a produção de $O_2^{\bullet-}$ basal e a estimulada pela ANG II nas artérias coronárias foi maior no grupo tratado em comparação com o grupo SHAM e orquiectomizado. Similarmente, Chignalia *et al.* (2012) mostraram que a testosterona por via genômica produz EROs pela ativação da NOX, isso sugere que a testosterona exógena modularia a atividade da NOX na síntese de $O_2^{\bullet-}$ em ausência dos outros hormônios testiculares.

Além disso, nem a testosterona endógena nem os outros hormônios testiculares parecem modular a atividade da NOX e a síntese basal de H_2O_2 nas artérias coronárias, no entanto parece ser modulada pela testosterona exógena em ausência dos outros hormônios testiculares. Também, a síntese de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 após estimulação com ANG II foram maiores nas artérias coronárias do grupo tratado. Isto sugere que a testosterona exógena em ausência dos outros hormônios testiculares, modularia a participação da EDH no relaxamento à BK com a conversão do $O_2^{\bullet-}$ para H_2O_2 pela SOD, cuja expressão e/ou atividade provavelmente esteja aumentada neste grupo.

Finalmente, a terapia de reposição com doses fisiológicas de testosterona aumentou o relaxamento induzido pela BK no leito vascular coronariano em SHR orquiectomizado, esse efeito foi independente da aromatização e com maior participação da EDH. Esta maior participação talvez ocorra por uma modulação pela testosterona exógena sobre a atividade da EDH, a qual ocorreria pelos seguintes mecanismos: *i*) modulação da expressão da CYP ou da síntese e/ou atividade dos metabólitos da CYP (EETs), *ii*) modulação da expressão e/ou função dos canais para potássio, *iii*) modulação da atividade da NOX, *iv*) modulação da síntese de $O_2^{\bullet-}$ pela CYP, *v*) modulação da atividade da SOD, *vi*) inibição da atividade da COX *vii*) *cross-talk* entre a via dos prostanóides e EDH (com diminuição da síntese de prostanóides e aumento da EDH), *viii*) participação da *Akt* na manutenção dum ambiente vascular saudável e *ix*) finalmente pela retirada dos outros hormônios testiculares da circulação

permitindo a ação somente da testosterona exógena em doses fisiológicas. Dessa maneira, a caracterização destes mecanismos poderia levar a uma melhor compreensão dos efeitos da testosterona sobre o leito vascular coronariano principalmente nos homens com hipogonadismo e com doença coronariana, contribuindo para um desenvolvimento de estratégias terapêuticas relacionadas ao tratamento do hipogonadismo em homens e consequentemente nas doenças cardiovasculares.

6. CONCLUSÃO

A terapia de reposição com doses fisiológicas de testosterona por 15 dias, aumenta o relaxamento induzido pela bradicinina no leito vascular coronariano de ratos espontaneamente hipertensos orquiectomizados. Esse efeito é independente da aromatização, com maior participação da hiperpolarização dependente do endotélio, com destaque da via dos ácidos epoxieicosatrienoicos (agindo sobre os canais para potássio) e provavelmente a participação do peroxido de hidrogênio, mecanismo que talvez seja modulado pelo o provável *cross-talk* entre prostanóides e a hiperpolarização dependente do endotélio, além da possível modulação favorável do ambiente vascular pela Akt. A caracterização desses mecanismos poderia levar a uma melhor compreensão dos efeitos do tratamento crônico com testosterona no leito vascular coronariano, além de contribuir ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas melhoradas para o tratamento do hipogonadismo e das doenças cardiovasculares.

7. REFERÊNCIAS

Abrams J 2005 Chronic Stable Angina. *New England Journal of Medicine* **352** 2524–2533. (doi:10.1056/NEJMcp042317)

Adams MR, Williams JK & Kaplan JR 1995 Effects of androgens on coronary artery atherosclerosis and atherosclerosis-related impairment of vascular responsiveness. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **15** 562–570. (doi:10.1161/01.ATV.15.5.562)

Altintas D, Kokcu A, Kandemir B, Tosun M & Cetinkaya MB 2010 Comparison of the effects of raloxifene and anastrozole on experimental endometriosis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* **150** 84–87. (doi:10.1016/j.ejogrb.2010.02.004)

Álvarez E, Cairrão E, Morgado M, Morais C & Verde I 2010 Testosterone and Cholesterol Vasodilation of Rat Aorta Involves L-Type Calcium Channel Inhibition. *Advances in Pharmacological Sciences* **2010** 1–10. (doi:10.1155/2010/534184)

Anderson TJ 1999 Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *Journal of the American College of Cardiology* **34** 631–638. (doi:10.1016/S0735-1097(99)00259-4)

Ardehali A & Ports TA 1990 Myocardial Oxygen Supply and Demand* *Cardiovascular Research Institute, and Division of Cardiology, Department of Medicine, University of California, San Francisco. *Chest* **98** 699–705. (doi:10.1378/chest.98.3.699)

Ballinger WF & Vollenweider H 1962 Anaerobic Metabolism of Heart. *Circulation Research* **11** 681–685. (doi:10.1161/01.RES.11.4.681)

Barlow RS & White RE 1998 Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BK Ca channel activity. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **275** H1283–H1289. (doi:10.1152/ajpheart.1998.275.4.H1283)

Baron A, Frieden M & Bény J-L 1997 Epoxyeicosatrienoic acids activate a high-conductance, Ca 2+ -dependent K + channel on pig coronary artery endothelial cells. *The Journal of Physiology* **504** 537–543. (doi:10.1111/j.1469-7793.1997.537bd.x)

Barrett-Connor E 1997 Sex Differences in Coronary Heart Disease. *Circulation* **95** 252–264. (doi:10.1161/01.CIR.95.1.252)

Barrett-Connor E & Khaw KT 1988 Endogenous sex hormones and cardiovascular disease in men. A prospective population-based study. *Circulation* **78** 539–545. (doi:10.1161/01.CIR.78.3.539)

Beierwaltes WH & Arendshorst WJ 1978 Renal function of conscious spontaneously hypertensive rats. *Circulation Research* **42** 721–726. (doi:10.1161/01.RES.42.5.721)

Bell RM, Mocanu MM & Yellon DM 2011 Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **50** 940–950. (doi:10.1016/j.yjmcc.2011.02.018)

Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, Chiuve SE, Cushman M, Delling FN, Deo R *et al.* 2018 Heart Disease and Stroke Statistics—2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **137** E67–E492. (doi:10.1161/CIR.0000000000000558)

Bennett NC, Gardiner RA, Hooper JD, Johnson DW & Gobe GC 2010 Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **42** 813–827. (doi:10.1016/j.biocel.2009.11.013)

Bingaman EW, Magnuson DJ, Gray TS & Handa RJ 1994 Androgen Inhibits the Increases in Hypothalamic Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) and CRH-Immunoreactivity following Gonadectomy. *Neuroendocrinology* **59** 228–234. (doi:10.1159/000126663)

Blanco-Rivero J, Balfagón G & Ferrer M 2005 Male Castration Increases Neuronal

Nitric Oxide Synthase Activity in the Rat Mesenteric Artery through Protein Kinase C Activation. *Journal of Vascular Research* **42** 526–534. (doi:10.1159/000088342)

Blanco-Rivero J, Balfagón G & Ferrer M 2006a Orchidectomy Modulates α_2-Adrenoceptor Reactivity in Rat Mesenteric Artery through Increased Thromboxane A_2 Formation. *Journal of Vascular Research* **43** 101–108. (doi:10.1159/000089791)

Blanco-Rivero J, Sagredo A, Balfagón G & Ferrer M 2006b Orchidectomy increases expression and activity of Cu/Zn-superoxide dismutase, while decreasing endothelial nitric oxide bioavailability. *The Journal of Endocrinology* **190** 771–778. (doi:10.1677/joe.1.06887)

Blanco-Rivero J, Sagredo A, Balfagon G & Ferrer M 2007 Protein kinase C activation increases endothelial nitric oxide release in mesenteric arteries from orchidectomized rats. *Journal of Endocrinology* **192** 189–197. (doi:10.1677/joe.1.07079)

Bonetti PO, Lerman LO & Lerman A 2003 Endothelial Dysfunction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **23** 168–175. (doi:10.1161/01.ATV.0000051384.43104.FC)

Braunwald E 1971 Control of myocardial oxygen consumption. *The American Journal of Cardiology* **27** 416–432. (doi:10.1016/0002-9149(71)90439-5)

Brinkmann AO 2011 Molecular Mechanisms of Androgen Action – A Historical Perspective. In *Springer*, pp 3–24. Ed F Saatcioglu. Totowa, NJ: Humana Press. (doi:10.1007/978-1-61779-243-4_1)

Brouillette J, Rivard K, Lizotte E & Fiset C 2005 Sex and strain differences in adult mouse cardiac repolarization: importance of androgens. *Cardiovascular Research* **65** 148–157. (doi:10.1016/j.cardiores.2004.09.012)

Buccafusco JJ 1996 The role of central cholinergic neurons in the regulation of blood pressure and in experimental hypertension. *Pharmacological Reviews* **48** 179–

211.

Buvat J, Maggi M, Guay A & Torres LO 2013 Testosterone Deficiency in Men: Systematic Review and Standard Operating Procedures for Diagnosis and Treatment. *The Journal of Sexual Medicine* **10** 245–284. (doi:10.1111/j.1743-6109.2012.02783.x)

Campbell WB & Harder DR 2001 Prologue: EDHF–what is it? *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **280** H2413–H2416. (doi:10.1152/ajpheart.2001.280.6.H2413)

Carson III CC & Rosano G 2012 Exogenous Testosterone, Cardiovascular Events, and Cardiovascular Risk Factors in Elderly Men: A Review of Trial Data. *The Journal of Sexual Medicine* **9** 54–67. (doi:10.1111/j.1743-6109.2011.02337.x)

Chang L-L, Wun W-SA & Wang PS 2008 Effects of dehydroepiandrosterone on aldosterone release in rat zona glomerulosa cells. *Journal of Biomedical Science* **15** 463–470. (doi:10.1007/s11373-008-9241-3)

Charalampopoulos I, Dermitzaki E, Vardouli L, Tsatsanis C, Stournaras C, Margioris AN & Gravanis A 2005 Dehydroepiandrosterone Sulfate and Allopregnanolone Directly Stimulate Catecholamine Production via Induction of Tyrosine Hydroxylase and Secretion by Affecting Actin Polymerization. *Endocrinology* **146** 3309–3318. (doi:10.1210/en.2005-0263)

Cheuk BLY, Leung PS, Lo ACT & Wong PYD 2000 Androgen Control of Cyclooxygenase Expression in the Rat Epididymis1. *Biology of Reproduction* **63** 775–780. (doi:10.1093/biolreprod/63.3.775)

Chignalia AZ, Schuldt EZ, Camargo LL, Montezano AC, Callera GE, Laurindo FR, Lopes LR, Avellar MCW, Carvalho MHC, Fortes ZB *et al.* 2012 Testosterone Induces Vascular Smooth Muscle Cell Migration by NADPH Oxidase and c-Src–Dependent Pathways. *Hypertension* **59** 1263–1271. (doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.180620)

Chobanian A V., Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT *et al.* 2003 Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* **42** 1206–1252. (doi:10.1161/01.HYP.0000107251.49515.c2)

Chou TM, Sudhir K, Hutchison SJ, Ko E, Amidon TM, Collins P & Chatterjee K 1996 Testosterone Induces Dilation of Canine Coronary Conductance and Resistance Arteries In Vivo. *Circulation* **94** 2614–2619. (doi:10.1161/01.CIR.94.10.2614)

Claessens F, Verrijdt G, Schoenmakers E, Haelens A, Peeters B, Verhoeven G & Rombauts W 2001 Selective DNA binding by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific gene regulation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **76** 23–30. (doi:10.1016/S0960-0760(00)00154-0)

CONCEA-MCT 2016 Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovacão Conselho Nacional de Controle de Experimentacão Animal-CONCEA. Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilizacão de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – DBCA. In *Brazilian Government*, pp 1–50. https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/DBCA_RN.30.pdf.

Cooke JP 2000 The endothelium: a new target for therapy. *Vascular Medicine* **5** 49–53. (doi:10.1191/135886300674617951)

Costa ED, Silva JF, Aires RD, Garcia DC, Kansaon MJ, Wainstein AJ, Rezende BA, Teixeira MM, Silva RF, Cortes SF *et al.* 2018 Neuronal nitric oxide synthase contributes to the normalization of blood pressure in medicated hypertensive patients. *Nitric Oxide* **80** 98–107. (doi:10.1016/j.niox.2018.09.003)

Costarella CE, Stallone JN, Rutecki GW & Whittier FC 1996 Testosterone causes direct relaxation of rat thoracic aorta. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **277** 34–39.

Crane GJ & Garland CJ 2004 Thromboxane receptor stimulation associated with loss of SK Ca activity and reduced EDHF responses in the rat isolated mesenteric artery. *British Journal of Pharmacology* **142** 43–50. (doi:10.1038/sj.bjp.0705756)

Crews JK & Khalil RA 1999 Antagonistic Effects of 17β-Estradiol, Progesterone, and Testosterone on Ca 2+ Entry Mechanisms of Coronary Vasoconstriction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **19** 1034–1040. (doi:10.1161/01.ATV.19.4.1034)

Deenadayalu VP, White RE, Stallone JN, Gao X & Garcia AJ 2001 Testosterone relaxes coronary arteries by opening the large-conductance, calcium-activated potassium channel. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **281** H1720–H1727. (doi:10.1152/ajpheart.2001.281.4.H1720)

Deenadayalu V, Puttabyatappa Y, Liu AT, Stallone JN & White RE 2012 Testosterone-induced relaxation of coronary arteries: activation of BK Ca channels via the cGMP-dependent protein kinase. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **302** H115–H123. (doi:10.1152/ajpheart.00046.2011)

Ding AQ & Stallone JN 2001 Testosterone-induced relaxation of rat aorta is androgen structure specific and involves K + channel activation. *Journal of Applied Physiology* **91** 2742–2750. (doi:10.1152/jappl.2001.91.6.2742)

Dregan A, Stewart R & Gulliford MC 2013 Cardiovascular risk factors and cognitive decline in adults aged 50 and over: a population-based cohort study. *Age and Ageing* **42** 338–345. (doi:10.1093/ageing/afs166)

Duncker DJ & Bache RJ 2008 Regulation of Coronary Blood Flow During Exercise. *Physiological Reviews* **88** 1009–1086. (doi:10.1152/physrev.00045.2006)

Dunn JF, Nisula BC & Rodbard D 1981 Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **53** 58–68. (doi:10.1210/jcem-53-1-58)

Dusting GJ, Moncada S & Vane JR 1977 Prostacyclin (PGX) is the endogeneous metabolite responsible for relaxation of coronary arteries induced by arachidonic acid. *Prostaglandins* **13** 3–15. (doi:10.1016/0090-6980(77)90037-5)

Endemann DH & Schiffrin EL 2004 Endothelial dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **15** 1983–1992. (doi:10.1097/01.ASN.0000132474.50966.DA)

Engelmann GL, Vitullo JC & Gerrity RG 1987 Morphometric analysis of cardiac hypertrophy during development, maturation, and senescence in spontaneously hypertensive rats. *Circulation Research* **60** 487–494. (doi:10.1161/01.RES.60.4.487)

English KM, Jones RD, Jones TH, Morice AH & Channer KS 2000a Aging reduces the responsiveness of coronary arteries from male Wistar rats to the vasodilatory action of testosterone. *Clinical Science (London, England : 1979)* **99** 77–82. (doi:10.1042/CS19990345)

English KM, Steeds RP, Jones TH, Diver MJ & Channer KS 2000b Low-Dose Transdermal Testosterone Therapy Improves Angina Threshold in Men With Chronic Stable Angina. *Circulation* **102** 1906–1911. (doi:10.1161/01.CIR.102.16.1906)

Farhat MY, Lavigne MC & Ramwell PW 1996 The vascular protective effects of estrogen. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **10** 615–624. (doi:10.1096/fasebj.10.5.8621060)

Feigl EO 1983 Coronary physiology. *Physiological Reviews* **63** 1–205. (doi:10.1152/physrev.1983.63.1.1)

Félétou M & Vanhoutte PM 2006 Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **26** 1215–1225. (doi:10.1161/01.ATV.0000217611.81085.c5)

Félétou M & Vanhoutte PM 2013 Endothelium-Dependent Hyperpolarization. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **61** 91–92. (doi:10.1097/FJC.0b013e31828197bc)

Figueroa-Valverde L, Díaz-Cedillo F, Diaz-Ku E & Camacho-Luis A 2009 Effect induced by hemisuccinate of pregnenolone on perfusion pressure and vascular resistance in isolated rat heart. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* **3** 234–241.

Figueroa-Valverde L, Ceballos-Reyes G, Díaz-Cedillo F, Camacho-Luis A, Ramos ML & Maldonado-Velazquez G 2010 Biological activity of progesterone-dihydropyridimidine derivative on perfusion pressure and coronary resistance in isolated rat heart. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* **4** 170–177. (doi:10.5897/AJPP)

Fischer M, Baessler A & Schunkert H 2002 Renin angiotensin system and gender differences in the cardiovascular system. *Cardiovascular Research* **53** 672–677. (doi:10.1016/S0008-6363(01)00479-5)

Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I & Busse R 1999 Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature* **401** 493–497. (doi:10.1038/46816)

Fortepiani LA & Reckelhoff JF 2005 Role of oxidative stress in the sex differences in blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension* **23** 801–805. (doi:10.1097/01.hjh.0000163149.05083.13)

Fritz M & Rinaldi G 2008 Blood pressure measurement with the tail-cuff method in Wistar and spontaneously hypertensive rats: Influence of adrenergic- and nitric oxide-mediated vasomotion. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **58** 215–221. (doi:10.1016/j.vascn.2008.08.002)

Fulton D, Mahboubi K, McGiff JC & Quilley J 1995 Cytochrome P450-dependent effects of bradykinin in the rat heart. *British Journal of Pharmacology* **114** 99–102. (doi:10.1111/j.1476-5381.1995.tb14911.x)

Fulton D, McGiff JC & Quilley J 1996 Role of phospholipase C and phospholipase A2 in the nitric oxide-independent vasodilator effect of bradykinin in the rat perfused heart. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **278** 518–526.

Fulton D, McGiff JC, Wolin MS, Kaminski P & Quilley J 1997 Evidence against a cytochrome P450-derived reactive oxygen species as the mediator of the nitric oxide-independent vasodilator effect of bradykinin in the perfused heart of the rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **280** 702–709.

Fulton D, Mcgiff JC & Quilley J 1998 Pharmacological evaluation of an epoxide as the putative hyperpolarizing factor mediating the nitric oxide-independent vasodilator effect of bradykinin in the rat heart. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **287** 497–503.

Fulton D, Gratton J-P, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A & Sessa WC 1999 Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* **399** 597–601. (doi:10.1038/21218)

Furchgott RF & Zawadzki J V. 1980 The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288** 373–376. (doi:10.1038/288373a0)

Gauthier KM, Edwards EM, Falck JR, Reddy DS & Campbell WB 2005 14,15-Epoxyeicosatrienoic Acid Represents a Transferable Endothelium-Dependent Relaxing Factor in Bovine Coronary Arteries. *Hypertension* **45** 666–671. (doi:10.1161/01.HYP.0000153462.06604.5d)

Gonzales RJ, Krause DN & Duckles SP 2004 Testosterone suppresses endothelium-dependent dilation of rat middle cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**. (doi:10.1152/ajpheart.00663.2003)

Goodwill AG, Dick GM, Kiel AM & Tune JD 2017 Regulation of Coronary Blood Flow. *Comprehensive Physiology* **7** 321–382. (doi:10.1002/cphy.c160016)

Hamet P, Pausova Z, Adarichev V, Adaricheva K & Tremblay J 1998 Hypertension: Genes and environment. *Journal of Hypertension* **16** 397–418. (doi:10.1097/00004872-199816040-00001)

Handa RJ, Nunley KM, Lorens SA, Louie JP, McGivern RF & Bollnow MR 1994 Androgen regulation of adrenocorticotropin and corticosterone secretion in the male rat following novelty and foot shock stressors. *Physiology & Behavior* **55** 117–124. (doi:10.1016/0031-9384(94)90018-3)

Handa RJ, Kudwa AE, Donner NC, McGivern RF & Brown R 2013 Central 5-alpha reduction of testosterone is required for testosterone's inhibition of the hypothalamo-pituitary–adrenal axis response to restraint stress in adult male rats. *Brain Research* **1529** 74–82. (doi:10.1016/j.brainres.2013.07.021)

Haring R, John U, Völzke H, Nauck M, Dörr M, Felix SB & Wallaschofski H 2012 Low Testosterone Concentrations in Men Contribute to the Gender Gap in Cardiovascular Morbidity and Mortality. *Gender Medicine* **9** 557–568. (doi:10.1016/j.genm.2012.10.007)

Hayabuchi Y, Nakaya Y, Matsuoka S & Kuroda Y 1998 Hydrogen peroxide-induced vascular relaxation in porcine coronary arteries is mediated by Ca2+-activated K+ channels. *Heart and Vessels* **13** 9–17. (doi:10.1007/BF02750638)

Herman SM, Robinson JTC, McCredie RJ, Adams MR, Boyer MJ, Celermajer DS, Mark S, Herman SM, Robinson JTC, McCredie RJ *et al.* 1997 Androgen Deprivation Is Associated With Enhanced Endothelium-Dependent Dilatation in Adult Men. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **17** 2004–2009. (doi:10.1161/01.ATV.17.10.2004)

Honda H, Unemoto T & Kogo H 1999 Different Mechanisms for Testosterone-Induced Relaxation of Aorta Between Normotensive and Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension* **34** 1232–1236. (doi:10.1161/01.HYP.34.6.1232)

Hu S & Kim HS 1993 Activation of K+ channel in vascular smooth muscles by cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid. *European Journal of*

Pharmacology **230** 215–221. (doi:10.1016/0014-2999(93)90805-R)

Hughes GS, Mathur RS & Margolius HS 1989 Sex steroid hormones are altered in essential hypertension. *Journal of Hypertension* **7** 181–187. (doi:10.1097/00004872-198903000-00003)

Ibrahim J, Berk BC & Hughes AD 2006 Comparison of Simultaneous Measurements of Blood Pressure by Tail-Cuff and Carotid Arterial Methods in Conscious Spontaneously Hypertensive and Wistar-Kyoto Rats. *Clinical and Experimental Hypertension* **28** 57–72. (doi:10.1080/10641960500386817)

James PA, Oparil S, Carter BL, Cushman WC, Dennison-Himmelfarb C, Handler J, Lackland DT, LeFevre ML, MacKenzie TD, Ogedegbe O *et al.* 2014 2014 Evidence-Based Guideline for the Management of High Blood Pressure in Adults. *JAMA* **311** 507. (doi:10.1001/jama.2013.284427)

Jenkins C, Salisbury R & Ely D 1994 Castration Lowers and Testosterone Restores Blood Pressure in Several Rat Strains on High Sodium Diets. *Clinical and Experimental Hypertension* **16** 611–625. (doi:10.3109/10641969409067965)

Jones TH 2010 Testosterone deficiency: a risk factor for cardiovascular disease? *Trends in Endocrinology & Metabolism* **21** 496–503. (doi:10.1016/j.tem.2010.03.002)

Jones TH & Saad F 2009 The effects of testosterone on risk factors for, and the mediators of, the atherosclerotic process. *Atherosclerosis* **207** 318–327. (doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.04.016)

Jones RD, Pugh PJ, Jones TH & Channer KS 2003 The vasodilatory action of testosterone: a potassium-channel opening or a calcium antagonistic action? *British Journal of Pharmacology* **138** 733–744. (doi:10.1038/sj.bjp.0705141)

Jones RD, English KM, Jones TH & Channer KS 2004 Testosterone-induced coronary vasodilatation occurs via a non-genomic mechanism: evidence of a direct calcium antagonism action. *Clinical Science* **107** 149–158. (doi:10.1042/cs20030386)

Kau M-M, Lo M-J, Wang S-W, Tsai S-C, Chen J-J, Chiao Y-C, Yeh J-Y, Lin H, Shum AY-C, Fang VS *et al.* 1999 Inhibition of aldosterone production by testosterone in male rats. *Metabolism* **48** 1108–1114. (doi:10.1016/S0026-0495(99)90123-3)

Kawasaki K, Smith RS, Hsieh C-M, Sun J, Chao J & Liao JK 2003 Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase Akt Pathway Mediates Nitric Oxide-Induced Endothelial Cell Migration and Angiogenesis. *Molecular and Cellular Biology* **23** 5726–5737. (doi:10.1128/MCB.23.16.5726-5737.2003)

Kelly DM & Jones TH 2013a Testosterone: a vascular hormone in health and disease. *Journal of Endocrinology* **217** R47–R71. (doi:10.1530/JOE-12-0582)

Kelly DM & Jones TH 2013b Testosterone: a metabolic hormone in health and disease. *Journal of Endocrinology* **217** R25–R45. (doi:10.1530/JOE-12-0455)

Kelly DM & Jones TH 2014 Testosterone and cardiovascular risk in men. *Frontiers of Hormone Research* **43** 1–20. (doi:10.1159/000360553)

Khaw KT & Barrett-Connor E 1988 Blood pressure and endogenous testosterone in men: an inverse relationship. *Journal of Hypertension* **6** 329–332.

Kim SF, Huri DA & Snyder SH 2005 Inducible nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2. *Science (New York, N.Y.)* **310** 1966–1970. (doi:10.1126/science.1119407)

Kinlay S & Ganz P 1997 Role of Endothelial Dysfunction in Coronary Artery Disease and Implications for Therapy. *The American Journal of Cardiology* **80** 11I–16I. (doi:10.1016/S0002-9149(97)00793-5)

Kitay JI 1963 Pituitary-Adrenal Function in the Rat After Gonadectomy and Gonadal Hormone Replacement1. *Endocrinology* **73** 253–260. (doi:10.1210/endo-73-2-253)

Kloner RA, Carson C, Dobs A, Kopecky S & Mohler ER 2016 Testosterone and Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology* **67** 545–

557. (doi:10.1016/j.jacc.2015.12.005)

Kurokawa J, Kodama M, Clancy CE & Furukawa T 2016 Sex hormonal regulation of cardiac ion channels in drug-induced QT syndromes. *Pharmacology & Therapeutics* **168** 23–28. (doi:10.1016/j.pharmthera.2016.09.004)

Larsen BT, Miura H, Hatoum OA, Campbell WB, Hammock BD, Zeldin DC, Falck JR & Gutterman DD 2006 Epoxyeicosatrienoic and dihydroxyeicosatrienoic acids dilate human coronary arterioles via BK Ca channels: implications for soluble epoxide hydrolase inhibition. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **290** H491–H499. (doi:10.1152/ajpheart.00927.2005)

Lee Y-F, Shyr C-R, Thin TH, Lin W-J & Chang C 1999 Convergence of two repressors through heterodimer formation of androgen receptor and testicular orphan receptor-4: A unique signaling pathway in the steroid receptor superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96** 14724–14729. (doi:10.1073/pnas.96.26.14724)

Lerman A & Burnett JC 1992 Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. *Circulation* **86** III12-19.

Li P-L & Campbell WB 1997 Epoxyeicosatrienoic Acids Activate K + Channels in Coronary Smooth Muscle Through a Guanine Nucleotide Binding Protein. *Circulation Research* **80** 877–884. (doi:10.1161/01.RES.80.6.877)

Littleton-Kearney M & Hurn PD 2004 Testosterone as a Modulator of Vascular Behavior. *Biological Research For Nursing* **5** 276–285. (doi:10.1177/1099800403262927)

Liu PY, Death AK & Handelsman DJ 2003 Androgens and cardiovascular disease. *Endocrine Reviews* **24** 313–340. (doi:10.1210/er.2003-0005)

Liu X-K, Katchman A, Whitfield BH, Wan G, Janowski EM, Woosley RL & Ebert SN 2003 In vivo androgen treatment shortens the QT interval and increases the densities of inward and delayed rectifier potassium currents in orchiectomized

male rabbits. *Cardiovascular Research* **57** 28–36. (doi:10.1016/s0008-6363(02)00673-9)

Luisi S, Petraglia F, Benedetto C, Nappi RE, Bernardi F, Fadalti M, Reis FM, Luisi M & Genazzani AR 2000 Serum Allopregnanolone Levels in Pregnant Women: Changes during Pregnancy, at Delivery, and in Hypertensive Patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **85** 2429–2433. (doi:10.1210/jcem.85.7.6675)

Luo Z, Fujio Y, Kureishi Y, Rudic RD, Daumerie G, Fulton D, Sessa WC & Walsh K 2000 Acute modulation of endothelial Akt/PKB activity alters nitric oxide–dependent vasomotor activity in vivo. *Journal of Clinical Investigation* **106** 493–499. (doi:10.1172/JCI9419)

MacMahon S, Peto R, Cutler J, Collins R, Sorlie P, Neaton J, Abbott R, Godwin J, Dyer A & Stamler J 1990 Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1, Prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. *Lancet (London, England)* **335** 765–774. (doi:10.1016/0140-6736(90)90878-9)

Marcelli M 2017 Androgen Receptor in Health and Disease. In *Testosterone*, pp 21–73. Cham: Springer International Publishing. (doi:10.1007/978-3-319-46086-4_2)

Martín M del C, Balfagón G, Minoves N, Blanco-Rivero J & Ferrer M 2005 Androgen deprivation increases neuronal nitric oxide metabolism and its vasodilator effect in rat mesenteric arteries. *Nitric Oxide* **12** 163–176. (doi:10.1016/j.niox.2005.02.003)

Martorell A, Blanco-Rivero J, Aras-Lopez R, Sagredo A, Balfagon G & Ferrer M 2007 Orchidectomy increases the formation of prostanoids and modulates their role in the acetylcholine-induced relaxation in the rat aorta. *Cardiovascular Research* **77** 590–599. (doi:10.1093/cvr/cvm059)

Masubuchi Y, Kumai T, Uematsu A, Komoriyama K & Hirai M 1982 Gonadectomy-induced reduction of blood pressure in adult spontaneously hypertensive rats.

Acta Endocrinologica **101** 154–160.

Masuda K, Takanari H, Morishima M, Ma F, Wang Y, Takahashi N & Ono K 2018 Testosterone-mediated upregulation of delayed rectifier potassium channel in cardiomyocytes causes abbreviation of QT intervals in rats. *The Journal of Physiological Sciences* **68** 759–767. (doi:10.1007/s12576-017-0590-4)

Matoba T & Shimokawa H 2003 Hydrogen Peroxide Is an Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in Animals and Humans. *Journal of Pharmacological Sciences J Pharmacol Sci* **92** 1–6.

Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H & Takeshita A 2000 Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *Journal of Clinical Investigation* **106** 1521–1530. (doi:10.1172/JCI10506)

Matoba T, Shimokawa H, Kubota H, Morikawa K, Fujiki T, Kunihiro I, Mukai Y, Hirakawa Y & Takeshita A 2002 Hydrogen Peroxide Is an Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in Human Mesenteric Arteries. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **290** 909–913. (doi:10.1006/bbrc.2001.6278)

McCredie RJ, McCrohon JA, Turner L, Griffiths KA, Handelsman DJ & Celermajer DS 1998 Vascular reactivity is impaired in genetic females taking high-dose androgens. *Journal of the American College of Cardiology* **32** 1331–1335. (doi:10.1016/S0735-1097(98)00416-1)

Messerli FH, Garavaglia GE, Schmieder RE, Sundgaard-Riise K, Nunez BD & Amodeo C 1987 Disparate cardiovascular findings in men and women with essential hypertension. *Annals of Internal Medicine* **107** 158–161. (doi:10.7326/0003-4819-107-2-158)

Michel T & Vanhoutte PM 2010 Cellular signaling and NO production. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* **459** 807–816. (doi:10.1007/s00424-009-0765-9)

Michell BJ, Griffiths JE, Mitchelhill KI, Rodriguez-Crespo I, Tiganis T, Bozinovski S, de Montellano PRO, Kemp BE & Pearson RB 1999 The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Current Biology* **9** 845-S1. (doi:10.1016/S0960-9822(99)80371-6)

Moazed B, Quest D & Gopalakrishnan V 2009 Des-acyl ghrelin fragments evoke endothelium-dependent vasodilatation of rat mesenteric vascular bed via activation of potassium channels. *European Journal of Pharmacology* **604** 79–86. (doi:10.1016/j.ejphar.2008.10.032)

Montaño LM, Calixto E, Figueroa A, Flores-Soto E, Carbajal V & Perusquía M 2008 Relaxation of androgens on rat thoracic aorta: Testosterone concentration dependent agonist/antagonist L-type Ca2+ channel activity, and 5β-dihydrotestosterone restricted to L-type Ca2+ channel blockade. *Endocrinology* **149** 2517–2526. (doi:10.1210/en.2007-1288)

Morales A 2013 The Long and Tortuous History of the Discovery of Testosterone and Its Clinical Application. *The Journal of Sexual Medicine* **10** 1178–1183. (doi:10.1111/jsm.12081)

Morikawa K, Shimokawa H, Matoba T, Kubota H, Akaike T, Talukder MAH, Hatanaka M, Fujiki T, Maeda H, Takahashi S *et al.* 2003 Pivotal role of Cu,Zn-superoxide dismutase in endothelium-dependent hyperpolarization. *Journal of Clinical Investigation* **112** 1871–1879. (doi:10.1172/JCI200319351)

Moysés MR, Barker LA & Cabral AM 2001 Sex hormone modulation of serotonin-induced coronary vasodilation in isolated heart. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **34** 949–958. (doi:10.1590/S0100-879X2001000700014)

Mulligan T, Frick MF, Zuraw QC, Stemhagen A & McWhirter C 2006 Prevalence of hypogonadism in males aged at least 45 years: the HIM study. *International Journal of Clinical Practice* **60** 762–769. (doi:10.1111/j.1742-1241.2006.00992.x)

Nakao J, Chang W-C, Murota S-I & Orimo H 1981 Testosterone inhibits prostacyclin production by rat aortic smooth muscle cells in culture. *Atherosclerosis* **39** 203–

209. (doi:10.1016/0021-9150(81)90070-8)

Oettel M 2004 The endocrine pharmacology of testosterone therapy in men. *Naturwissenschaften* **91** 66–76. (doi:10.1007/s00114-003-0494-4)

Okamoto K & Aoki K 1963 Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese Circulation Journal* **27** 282–293.

Opie LH 1969 Metabolism of the heart in health and disease. Part III. *American Heart Journal* **77** 383–410. (doi:10.1016/0002-8703(69)90197-5)

Oskui PM, French WJ, Herring MJ, Mayeda GS, Burstein S & Kloner RA 2013 Testosterone and the Cardiovascular System: A Comprehensive Review of the Clinical Literature. *Journal of the American Heart Association* **2**. (doi:10.1161/JAHA.113.000272)

Palmer RMJ, Ferrige AG & Moncada S 1987 Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327** 524–526. (doi:10.1038/327524a0)

Pardridge WM 1986 Serum bioavailability of sex steroid hormones. *Clinics in Endocrinology and Metabolism* **15** 259–278. (doi:10.1016/S0300-595X(86)80024-X)

Park, Kim, Kim & Paick 2001 Effects of androgens on the expression of nitric oxide synthase mRNAs in rat corpus cavernosum. *BJU International* **83** 327–333. (doi:10.1046/j.1464-410x.1999.00913.x)

Payne AH & Jaffe RB 1975 Androgen formation from pregnenolone sulfate by fetal, neonatal, prepubertal and adult human testes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **40** 102–107. (doi:10.1210/jcem-40-1-102)

Peach MJ 1977 Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiological Reviews* **57** 313–370. (doi:10.1152/physrev.1977.57.2.313)

Peixoto P, da Silva JF, Aires RD, Costa ED, Lemos VS, Bissoli NS & dos Santos RL 2018 Sex difference in GPER expression does not change vascular relaxation or reactive oxygen species generation in rat mesenteric resistance arteries. *Life Sciences* **211** 198–205. (doi:10.1016/j.lfs.2018.09.036)

Penson DF, Ng C, Cai L, Rajfer J & González-Cadavid NF 1996 Androgen and Pituitary Control of Penile Nitric Oxide Synthase and Erectile Function in the Rat1. *Biology of Reproduction* **55** 567–574. (doi:10.1095/biolreprod55.3.567)

Perusquía M & Stallone JN 2010 Do androgens play a beneficial role in the regulation of vascular tone? Nongenomic vascular effects of testosterone metabolites. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **298** H1301–H1307. (doi:10.1152/ajpheart.00753.2009)

Phillips GB, Jing TY, Resnick LM, Barbagallo M, Laragh JH & Sealey JE 1993 Sex hormones and hemostatic risk factors for coronary heart disease in men with hypertension. *Journal of Hypertension* **11** 699–702.

Picon R V., Fuchs FD, Moreira LB, Riegel G & Fuchs SC 2012 Trends in Prevalence of Hypertension in Brazil: A Systematic Review with Meta-Analysis. *PLoS ONE* **7** e48255. (doi:10.1371/journal.pone.0048255)

Plane F & Garland CJ 1996 Influence of contractile agonists on the mechanism of endothelium-dependent relaxation in rat isolated mesenteric artery. *British Journal of Pharmacology* **119** 191–193. (doi:10.1111/j.1476-5381.1996.tb15970.x)

Popp R, Brandes RP, Ott G, Busse R & Fleming I 2002 Dynamic Modulation of Interendothelial Gap Junctional Communication by 11,12-Epoxyeicosatrienoic Acid. *Circulation Research* **90** 800–806. (doi:10.1161/01.RES.0000015328.20581.D6)

Pozzi A, Macias-Perez I, Abair T, Wei S, Su Y, Zent R, Falck JR & Capdevila JH 2005 Characterization of 5,6- and 8,9-Epoxyeicosatrienoic Acids (5,6- and 8,9-EET) as Potent in Vivo Angiogenic Lipids. *Journal of Biological Chemistry* **280** 27138–27146. (doi:10.1074/jbc.M501730200)

Puddu P, Puddu GM, Zaca F & Muscari A 2000 Endothelial dysfunction in hypertension. *Acta Cardiologica* **55** 221–232. (doi:10.2143/AC.55.4.2005744)

Puttabyatappa Y, Stallone JN, Ergul A, El-Remessy AB, Kumar S, Black S, Johnson M, Owen MP & White RE 2013 Peroxynitrite Mediates Testosterone-Induced Vasodilation of Microvascular Resistance Vessels. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **345** 7–14. (doi:10.1124/jpet.112.201947)

Ramírez-Rosas MB, Cobos-Puc LE, Muñoz-Islas E, González-Hernández A, Sánchez-López A, Villalón CM, Maassenvandenbrink A & Centurión D 2011 Pharmacological evidence that Ca2+ channels and, to a lesser extent, K+ channels mediate the relaxation of testosterone in the canine basilar artery. *Steroids* **76** 409–415. (doi:10.1016/j.steroids.2010.12.012)

Reckelhoff JF 2018 Gender differences in hypertension. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* **27** 176–181. (doi:10.1097/MNH.0000000000000404)

Reckelhoff JF, Zhang H & Granger JP 1998 Testosterone Exacerbates Hypertension and Reduces Pressure-Natriuresis in Male Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension* **31** 435–439. (doi:10.1161/01.HYP.31.1.435)

Reckelhoff JF, Zhang H, Srivastava K & Granger JP 1999 Gender Differences in Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension* **34** 920–923. (doi:10.1161/01.HYP.34.4.920)

Reckelhoff JF, Zhang H & Srivastava K 2000 Gender Differences in Development of Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension* **35** 480–483. (doi:10.1161/01.HYP.35.1.480)

Ribeiro ALP, Duncan BB, Brant LCC, Lotufo PA, Mill JG & Barreto SM 2016 Cardiovascular Health in Brazil. *Circulation* **133** 422–433. (doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.008727)

Rosano GMC, Leonardo F, Pagnotta P, Pelliccia F, Panina G, Cerquetani E, della

Monica PL, Bonfigli B, Volpe M & Chierchia SL 1999 Acute Anti-Ischemic Effect of Testosterone in Men With Coronary Artery Disease. *Circulation* **99** 1666–1670. (doi:10.1161/01.CIR.99.13.1666)

Rouver WN, Delgado NTB, Menezes JB, Santos RL & Moyses MR 2015 Testosterone Replacement Therapy Prevents Alterations of Coronary Vascular Reactivity Caused by Hormone Deficiency Induced by Castration. *PLOS ONE* **10** e0137111. (doi:10.1371/journal.pone.0137111)

Rowell KO, Hall J, Pugh PJ, Jones TH, Channer KS & Jones RD 2009 Testosterone acts as an efficacious vasodilator in isolated human pulmonary arteries and veins: evidence for a biphasic effect at physiological and supra-physiological concentrations. *Journal of Endocrinological Investigation* **32** 718–723. (doi:10.1007/BF03346526)

Rubinow DR, Roca CA, Schmidt PJ, Danaceau MA, Putnam K, Cizza G, Chrousos G & Nieman L 2005 Testosterone Suppression of CRH-Stimulated Cortisol in Men. *Neuropsychopharmacology* **30** 1906–1912. (doi:10.1038/sj.npp.1300742)

Salt PJ 1972 Inhibition of noradrenaline uptake2 in the isolated rat heart by steroids, clonidine and methoxylated phenylethylamines. *European Journal of Pharmacology* **20** 329–340. (doi:10.1016/0014-2999(72)90194-X)

Santos RL, Abreu GR, Bissoli NS & Moysés MR 2004 Endothelial mediators of 17ß-estradiol-induced coronary vasodilation in the isolated rat heart. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **37** 569–575. (doi:10.1590/S0100-879X2004000400014)

Santos RL, Marin EB, Gonçalves WLS, Bissoli NS, Abreu GR & Moysés MR 2010 Sex differences in the coronary vasodilation induced by 17 β-oestradiol in the isolated perfused heart from spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiologica* **200** 203–210. (doi:10.1111/j.1748-1716.2010.02140.x)

Santos RL, Lima JT, Rouver WN & Moysés MR 2016 Deficiency of sex hormones does not affect 17-ß-estradiol-induced coronary vasodilation in the isolated rat heart.

Brazilian Journal of Medical and Biological Research **49**. (doi:10.1590/1414-431X20165058)

Schiffrin EL 2001 A critical review of the role of endothelial factors in the pathogenesis of hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **38 Suppl 2** S3-6. (doi:10.1097/00005344-200111002-00002)

Schoenhagen P, Ziada KM, Kapadia SR, Crowe TD, Nissen SE & Tuzcu EM 2000 Extent and Direction of Arterial Remodeling in Stable Versus Unstable Coronary Syndromes. *Circulation* **101** 598–603. (doi:10.1161/01.CIR.101.6.598)

Schror K, Morinelli TA, Masuda A, Matsuda K, Mathur RS & Halushka P V. 1994 Testosterone treatment enhances thromboxane A 2 mimetic induced coronary artery vasoconstriction in guinea pigs. *European Journal of Clinical Investigation* **24** 50–52. (doi:10.1111/j.1365-2362.1994.tb02428.x)

Scornik FS & Toro L 1992 U46619, a thromboxane A2 agonist, inhibits KCa channel activity from pig coronary artery. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **262** C708–C713. (doi:10.1152/ajpcell.1992.262.3.C708)

Seyrek M, Yildiz O, Ulusoy HB & Yildirim V 2007 Testosterone Relaxes Isolated Human Radial Artery by Potassium Channel Opening Action. *Journal of Pharmacological Sciences* **103** 309–316. (doi:10.1254/jphs.FP0060883)

Shimokawa H 2010 Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **459** 915–922. (doi:10.1007/s00424-010-0790-8)

Shimokawa H & Matoba T 2004 Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pharmacological Research* **49** 543–549. (doi:10.1016/j.phrs.2003.10.016)

Simon D, Charles MA, Nahoul K, Orssaud G, Kremski J, Hully V, Joubert E, Papoz L & Eschwege E 1997 Association between plasma total testosterone and cardiovascular risk factors in healthy adult men: The Telecom Study. *The Journal*

of Clinical Endocrinology and Metabolism **82** 682–685. (doi:10.1210/jcem.82.2.3766)

Skrzypiec-Spring M, Grotthus B, Szeląg A & Schulz R 2007 Isolated heart perfusion according to Langendorff—Still viable in the new millennium. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **55** 113–126. (doi:10.1016/j.vascn.2006.05.006)

Smith AM, Bennett RT, Jones TH, Cowen ME, Channer KS & Jones RD 2008 Characterization of the vasodilatory action of testosterone in the human pulmonary circulation. *Vascular Health and Risk Management* **4** 1459–1466. (doi:10.2147/vhrm.s3995)

Song J, Kost CK & Martin DS 2006 Androgens potentiate renal vascular responses to angiotensin II via amplification of the Rho kinase signaling pathway. *Cardiovascular Research* **72** 456–463. (doi:10.1016/j.cardiores.2006.09.007)

Souness GW & Morris DJ 1996 11α- and 11β-Hydroxyprogesterone, Potent Inhibitors of 11β-Hydroxysteroid Dehydrogenase, Possess Hypertensinogenic Activity in the Rat. *Hypertension* **27** 421–425. (doi:10.1161/01.HYP.27.3.421)

Spronk PE, Zandstra DF & Ince C 2004 Bench-to-bedside review: sepsis is a disease of the microcirculation. *Critical Care (London, England)* **8** 462–468. (doi:10.1186/cc2894)

Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Rosner B, Speizer FE & Hennekens CH 1991 Postmenopausal Estrogen Therapy and Cardiovascular Disease. *New England Journal of Medicine* **325** 756–762. (doi:10.1056/NEJM199109123251102)

Svartberg J, von Muhlen D, Schirmer H, Barrett-Connor E, Sundfjord J & Jorde R 2004 Association of endogenous testosterone with blood pressure and left ventricular mass in men. The Tromso Study. *European Journal of Endocrinology* **150** 65–71. (doi:10.1530/eje.0.1500065)

Takaki A, Morikawa K, Tsutsui M, Murayama Y, Tekes E, Yamagishi H, Ohashi J, Yada T, Yanagihara N & Shimokawa H 2008 Crucial role of nitric oxide synthases system in endothelium-dependent hyperpolarization in mice. *The Journal of Experimental Medicine* **205** 2053–2063. (doi:10.1084/jem.20080106)

Tang EHC & Vanhoutte PM 2009 Prostanoids and reactive oxygen species: Team players in endothelium-dependent contractions. *Pharmacology & Therapeutics* **122** 140–149. (doi:10.1016/j.pharmthera.2009.02.006)

Tatchum-Talom R, Martel C & Marette A 2002 Effects of Ethinyl Estradiol, Estradiol, and Testosterone on Hindlimb Endothelial Function In Vivo. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **39** 496–502. (doi:10.1097/00005344-200204000-00005)

Teoh H, Quan A & Man RY 2000 Acute impairment of relaxation by low levels of testosterone in porcine coronary arteries. *Cardiovascular Research* **45** 1010–1018. (doi:10.1016/s0008-6363(99)00398-3)

Tep-areenan P, Kendall DA & Randall MD 2002 Testosterone-induced vasorelaxation in the rat mesenteric arterial bed is mediated predominantly via potassium channels. *British Journal of Pharmacology* **135** 735–740. (doi:10.1038/sj.bjp.0704522)

Thompson J & Khalil RA 2003 Gender differences in the regulation of vascular tone. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **30** 1–15. (doi:10.1046/j.1440-1681.2003.03790.x)

Toot JD, Reho JJ, Novak J, Dunphy G, Ely DL & Ramirez RJ 2011 Testosterone increases myogenic reactivity of second-order mesenteric arteries in both defective and normal androgen receptor adult male rats. *Gender Medicine* **8** 40–52. (doi:10.1016/j.genm.2011.01.002)

Torre B, Hedman M, Norén S & Sjöberg B 1986 Blood and tissue steroid levels and their interrelationship in men with pathological conditions of the reproductive organs. *International Journal of Andrology* **9** 241–249. (doi:10.1111/j.1365-

2605.1986.tb00887.x)

Traish AM, Haider A, Doros G & Saad F 2014 Long-term testosterone therapy in hypogonadal men ameliorates elements of the metabolic syndrome: An observational, long-term registry study. *International Journal of Clinical Practice* **68** 314–329. (doi:10.1111/ijcp.12319)

Trippodo NC & Frohlich ED 1981 Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. *Circulation Research* **48** 309–319. (doi:10.1161/01.RES.48.3.309)

Tsang S, Wu S, Liu J & Wong TM 2008 Testosterone protects rat hearts against ischaemic insults by enhancing the effects of α 1-adrenoceptor stimulation. *British Journal of Pharmacology* **153** 693–709. (doi:10.1038/sj.bjp.0707624)

Tsang S, Wong SSC, Wu S, Kravtsov GM & Wong T-M 2009 Testosterone-augmented contractile responses to α 1 - and β 1 -adrenoceptor stimulation are associated with increased activities of RyR, SERCA, and NCX in the heart. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **296** C766–C782. (doi:10.1152/ajpcell.00193.2008)

Tune JD 2014 Coronary Circulation. *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function* **6** 1–189. (doi:10.4199/C00111ED1V01Y201406ISP054)

Tune JD, Gorman MW & Feigl EO 2004 Matching coronary blood flow to myocardial oxygen consumption. *Journal of Applied Physiology* **97** 404–415. (doi:10.1152/japplphysiol.01345.2003)

Udenfriend S & Spector S 1972 Spontaneously Hypertensive Rat. *Science* **176** 1155–1156. (doi:10.1126/science.176.4039.1155)

Upmacis RK, Deeb RS & Hajjar DP 1999 Regulation of Prostaglandin H 2 Synthase Activity by Nitrogen Oxides †. *Biochemistry* **38** 12505–12513. (doi:10.1021/bi983049e)

Vasan RS, Larson MG, Leip EP, Evans JC, O'Donnell CJ, Kannel WB & Levy D 2001

Impact of High-Normal Blood Pressure on the Risk of Cardiovascular Disease. *New England Journal of Medicine* **345** 1291–1297. (doi:10.1056/NEJMoa003417)

Wang Y, Wei X, Xiao X, Hui R, Card JW, Carey MA, Wang DW & Zeldin DC 2005 Arachidonic acid epoxygenase metabolites stimulate endothelial cell growth and angiogenesis via mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **314** 522–532. (doi:10.1124/jpet.105.083477)

Webb CM, McNeill JG, Hayward CS, de Zeigler D & Collins P 1999 Effects of Testosterone on Coronary Vasomotor Regulation in Men With Coronary Heart Disease. *Circulation* **100** 1690–1696. (doi:10.1161/01.CIR.100.16.1690)

Williamson M, Bingham B & Viau V 2005 Central organization of androgen-sensitive pathways to the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: Implications for individual differences in responses to homeostatic threat and predisposition to disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **29** 1239–1248. (doi:10.1016/j.pnpbp.2005.08.009)

Wu FCW & Von Eckardstein A 2003 Androgens and coronary artery disease. *Endocrine Reviews* **24** 183–217. (doi:10.1210/er.2001-0025)

Xu X, de Pergola G & Björntorp P 1991 Testosterone increases lipolysis and the number of β-adrenoceptors in male rat adipocytes. *Endocrinology* **128** 379–382. (doi:10.1210/endo-128-1-379)

Yildiz O, Seyrek M, Gul H, Un I, Yildirim V, Ozal E, Uzun M & Bolu E 2005 Testosterone Relaxes Human Internal Mammary Artery In Vitro. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **45** 580–585. (doi:10.1097/01.fjc.0000161400.06704.1e)

Yue P, Chatterjee K, Beale C, Poole-Wilson PA & Collins P 1995 Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta. *Maturitas* **22** 266–267. (doi:10.1016/0378-5122(95)99344-2)

Zhao Y, Vanhoutte PM & Leung SWS 2015 Vascular nitric oxide: Beyond eNOS.

Journal of Pharmacological Sciences **129** 83–94. (doi:10.1016/j.jphs.2015.09.002)

Zhao J, Liu G-L, Wei Y, Jiang L-H, Bao P-L & Yang Q-Y 2016 Low-dose testosterone alleviates vascular damage caused by castration in male rats in puberty via modulation of the PI3K/AKT signaling pathway. *Molecular Medicine Reports* **14** 2518–2526. (doi:10.3892/mmr.2016.5562)

Zhou P, Fu L, Pan Z, Ma D, Zhang Y, Qu F, Guo L, Cao J, Gao Q & Han Y 2008 Testosterone deprivation by castration impairs expression of voltage-dependent potassium channels in rat aorta. *European Journal of Pharmacology* **593** 87–91. (doi:10.1016/j.ejphar.2008.07.014)