

**Privação de testosterona promove queda de
contratilidade em músculos papilares isolados de
ratos espontaneamente hipertensos (SHR): Papel do
sistema renina angiotensina.**

Marito Afonso Sousa Costa Silva

Tese de doutorado em Ciências Fisiológicas
Fisiologia Cardiovascular

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

Vitória, 2019

Privação de testosterona promove queda de contratilidade em músculos papilares isolados de ratos espontaneamente hipertensos (SHR): Papel do sistema renina angiotensina.

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora:

Prof.^a Dra. Alessandra Simão Padilha
(PPGCF/UFES/ES)

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

Vitória, ES

2019

Privação de testosterona promove queda de contratilidade em músculos papilares isolados de ratos espontaneamente hipertensos (SHR): Papel do sistema renina angiotensina.

Marito Afonso Sousa Costa Silva

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 26/06/2019

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Alessandra Simão Padilha
Orientadora, UFES

Prof.^a Dra. Nazaré Souza Bissoli
Membro interno, UFES

Prof^o. Dr^o. Dalton Valentim Vassallo
Membro interno, UFES

Prof.^a Dra. Aurélio Araujo Fernandes Soares
Membro externo do programa PPGCF, UFES

Prof^o. Dr^o. Marcelo Perim Baldo
Membro externo Ufes, Unimontes

Silva, Marito Afonso Sousa Costa 1988

O Tratamento com telmisartan por 8 semanas previne a queda de contratilidade em músculos papilares isolados de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) orquiectomizados [Vitória] 2019

91p, 29,7 cm (UFES, D. Sc., Ciências Fisiológicas, 2019)

Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Simão Padilha

Palavras chaves: Contratilidade miocárdica; Sistema renina angiotensina; PPAR Gama; músculos papilares.

Dedico aos meus pais. Meus maiores incentivadores.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens,
mas em ter novos olhos”.

Marcel Proust

AGRADECIMENTOS

Este espaço é dedicado aqueles que deram a sua contribuição para que esta tese fosse realizada. A todos eles deixo aqui o meu agradecimento sincero.

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pela força, saúde e coragem durante toda esta longa caminhada.

Aos meus pais e aos meus irmãos, pela dedicação, pelo sacrifício e acima de tudo pelo apoio incondicional. A família é o nosso maior patrimônio.

À Profa. Dra. Alessandra por me aceitar como aluno de mestrado e agora como doutorando. Com certeza esses 7 anos que eu estive sob a sua orientação foram de muito aprendizado e espero que essa parceria possa durar ainda muito tempo.

À Profa. Dra Ivanita pelas várias sugestões durante as reuniões de discussão dos meus dados. Fato que o resultado final do nosso trabalho vem bastante das suas contribuições.

À professora Nazaré pela coorientação, pela ajuda, pelo apoio e disponibilidade e, principalmente por ter cedido este projeto e possibilitado a parceria na realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Dalton, e ao Prof Dr. Leonardo pela disponibilidade e dedicação e pelas sugestões e observações científicas.

Ao Marcos Birocali pela parceria e pela grande ajuda no tratamento e na castração dos ratos.

À Renata pela grande parceria. Parceira de todas as horas. Muito obrigado por tudo, Rena. Obrigado por me ajudar prontamente por tudo que eu te peço. A cara final desse trabalho com certeza tem os seus digitais.

À Dieli, minha grande irmã. Pronta para ajudar sempre, parceira para todas as horas. Muito obrigado brow pela ajuda, pelas conversas e por preocupar sempre!

Ao Bernah, Olavo e Gustavo, pela amizade, pelo apoio, pelos momentos de descontração para cada experimente errado, pela disponibilidade em me ajudar em tudo o que eu preciso. Vocês são mais do que amigos.

Ao Jair, por acreditar em mim, pelos bons conselhos, pela boa influência e acima de tudo, pelo apoio e por cedido o NIDA para que eu pudesse escrever a tese de forma tranquila.

À Simone, por sua generosidade. Obrigado por ter acreditado em mim e ao apoio sempre.

Aos colegad de república Carlos (kuiu) e o Zeca, obrigado pelos conselhos, pelo apoio e pela ajuda.

Aos meus amigos conterrâneos: Denilson, Arickson, Samora, Djidja, Álvaro, Djonny, Edson e Helder. Obrigado por bons momentos.

À grande família LEMC: Cindy, Emilly, Gércica, João Vitor, Mayla, Paula, strela, Fileti, Samya, Tatiani, Thiago, Vinícius, Sabrina, Priscila, e karolini, Wilmar, Nay, Raquel, Grazi, Evelyn, Pamola, Bruno, Ingride. Um muito abrigado a todos, por bons momentos, por se importar em horas difíceis e principalmente pelo presente de aniversário.

Aos meus amigos da Farmaufes 2007/1, pela amizade e pelos momentos de descontração e por compartilhar comigo tantos momentos de desespero quando de felicidade.

Aos funcionários e professores do Programa, pela prontidão e ensinamentos compartilhados.

Aos colegas de outros laboratórios, que juntos compartilhamos muitos momentos de preocupação e alegria no decorrer das disciplinas.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Testosterona e o sistema cardiovascular.....	22
1.1.1 Hipertensão arterial.....	23
1.1.2 Deficiência de testosterona e hipertensão arterial.....	23
1.2 Sistema Renina-Angiotensina.....	26
1.3 Acoplamento excitação-contração cardíaca.....	32
1.4 Os PPARs.....	35
2. Justificativa.....	39
3. Objetivos.....	40
3.1 Objetivo geral:.....	40
3.2 Objetivos específicos:.....	40
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 Orquiectomia.....	41
4.2 Análise da medida indireta da pressão arterial sistólica.....	41
4.3 Animais experimentais.....	41
4.4 Modelo Experimental.....	42
4.5 Avaliação ponderal.....	42
4.6 Metodologia empregada para avaliar a contratilidade cardíaca pela técnica de músculos papilares isolados.....	43
4.6.1 Montagem da preparação.....	43
4.6.2 Protocolos experimentais.....	44
4.6.3 Avaliação indireta da atividade do retículo sarcoplasmático.....	44
4.6.4 Avaliação da resposta contrátil frente a mudanças na concentração de cálcio extracelular.....	45
4.6.5 Medida indireta do influxo de cálcio transsarcolemal “ <i>post rest contraction-prc</i> ”.....	45
4.6.6 Avaliação da resposta contrátil frente à estimulação beta-adrenérgica.....	46
4.7 Western blot.....	48

4.8	Análise histológica.....	49
4.9	Análise estatística.....	50
4.10	Fármacos e reagentes	51
5.	RESULTADOS.....	53
5.1	Avaliação ponderal.....	53
5.2	Avaliação da pressão arterial sistólica pela técnica de pletismografia de caúda.....	53
5.3	Avaliação da contratilidade miocárdica em músculos papilares isolados...	54
5.4	Análise histológica.....	60
6.	DISCUSSÃO.....	62
7.	CONCLUSÃO:	75
8.	REFERÊNCIAS	76

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Efeito do tratamento com telmisartan sobre o peso corporal, o peso do coração, o comprimento da tíbia, razão comprimento da tíbia / peso do coração e a pressão arterial.....54

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Figura esquemática pelo qual os andrógenos poderiam afetar o SRAA causando um incremento na pressão arterial. Nota-se que ao que tudo indica os andrógenos aumentam a atividade de renina que leva a um aumento na quantidade de angiotensina II circulante. Essa Angio II aumentada medeia ações como aumento do estresse oxidativo, vasoconstrição da artéria renal e aumento da reabsorção de sódio levando ao um aumento da pressão arterial. O aumento na reabsorção de sódio causa uma atenuação da pressão-natriurese contribuindo mais ainda para o aumento da PA. (Reckelhoff JF 2001).....31
- Figura 2.** Representação do processo de acoplamento excitação–contração do músculo cardíaco. SR: retículo sarcoplasmático, ATP: ATPase, PLB: fosfolamban, NCX: trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, RyR: receptor de Rianodina, AP: potencial de ação, I_{Ca} : corrente de Ca^{2+} . Bers, 2002.....35
- Figura 3.** Esquema representativo do sistema de avaliação da contratilidade de músculo papilares. 1: transdutor de força, 2: sistema de aeração com mistura carbogênica, 3: eletrodos, 4: banho, 5: cuba, 6: eletroestimulador.....44
- Figura 4.** Esquema representativo do protocolo de avaliação de contratilidade de músculos papilares. TP: Tempo para o Pico de força, TR_{50} : Tempo para 50% do relaxamento, PPP: Potenciação Pós Pausa, PRC: Post Resting Contraction.....47
- Figura 5:** Peso do papilar, força isométrica desenvolvida, primeiras derivadas do desenvolvimento de força e parâmetros temporais de contração dos músculos papilares do ventrículo esquerdo de ratos de todos os grupos experimentais. (A) Peso papilar (B) força isométrica, (C) tempo de ativação e (D) tempo para 50% de relaxamento, (E) derivada máxima positiva e (F) derivada máxima negativa da força ($+dF/dt_{\text{max}}$ e $-dF/dt_{\text{max}}$ respectivamente). Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Os dados são expressos como média \pm SEM. * $P < 0,05$, one-way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Fischer para comparações múltiplas.....55

Figura 6: Avaliação, in vitro, das potenciações relativas após as pausas de 15, 30 e 60 segundos dos músculos papilares do VE de ratos Sham, orquiectomizados (OQT), orquiectomizados tratados com telmisartan (OQT + Tel), orquiectomizados tratados com telmisartan e BADGE (OQT + Tel + BADGE). Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Os dados são expressos como média ± SEM. * P <0,05 vs Sham; & P <0,05 vs OQT: ANOVA two-way seguido pelo teste post-hoc de Fischer para comparações múltiplas.....56

Figura 7: Resposta contrátil á diferentes protocolos experimentais e análise densitométrica de Western blots de ratos Sham, orquiectomizados (OQT), orquiectomizados tratados com telmisartan (OQT + Tel), orquiectomizados tratados com telmisartan e BADGE (OQT + Tel + BADGE). (A) Força desenvolvida durante incrementos da concentração de Ca²⁺, (B) respostas inotrópicas do músculo cardíaco ao isoproterenol, (C) Contração dependente do influxo de cálcio trans -arcolemal, (D) SERCA2 (6), (E) NCX (6), (F) PBL (6), (G) pPBLSer¹⁶ (6), (H) AT1(6), (I) PPARg (6). Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Os dados são expressos como média ± SEM. * P <0,05 vs Sham; \$ P <0,05 vs OQT, # P <0,05 vs OQT + Tel, & P <0,05 vs OQT vs OQT BADGE.....59

Figura 8: Indicadores de tamanho nuclear e deposição de colágeno no coração. (A) Perímetro nuclear, (B) Área nuclear, (C) Teor de colágeno de ratos Sham, orquiectomizados (OQT), orquiectomizados tratados com telmisartan (OQT + Tel), orquiectomizados tratados com telmisartan e BADGE (OQT + Tel + BADGE). Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Os dados são expressos como média ± SEM. * P <0,05, one-way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Fischer para comparações múltiplas.....61

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

AEC- acoplamento excitação-contração
Angio II- Angiotensina II
AMPc: adenosina monofosfato cíclico
ATP- 5'-trifosfato de adenosina
AT1R- Receptor de angiotensina subtipo 1
AT2R- Receptor de angiotensina subtipo 2
Ca²⁺: cálcio
COX2: Ciclo-oxigenase-2
DCV: doenças cardiovasculares
DHT- di-hidrotestosterona
dP/dt (-): Derivada temporal de pressão negativa
dP/dt (+): Derivada temporal de pressão positiva
ECA- enzima conversora de angiotensina
F: Força desenvolvida pelos músculos papilares
fosfo-Ser16-PLB: Fosfolambam fosforilado na serina-16
GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GnRH- hormônio liberador de gonadotrofinas
Gs -proteína G
HA- hipertensão arterial
iNOS: Óxido nítrico sintase induzível
K- Potássio
LH- Hormônio luteinizante
Lmax: Comprimento de músculo no qual a tensão ativa é máxima
NA- noradrenalina
NADPH: fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NCX: trocador sódio/cálcio
MHC- cadeias pesadas de miosina
PBL- fosfolambam
PA- Potencial de ação.
PKA- proteína quinase A
PPAR α - receptores ativados por proliferadores de peroxissoma alfa
PPAR δ - receptores ativados por proliferadores de peroxissoma delta.

PPAR γ - receptores ativados por proliferadores de peroxissoma Gamma

PPP: Potenciações relativas pós-pausa

PRC: Contrações após repouso de 10 minutos

RyRs- rianodina

RS- Reticulo sarcoplasmático

ROS- espécies reativas de oxigênio

SERCA: Bomba de Ca²⁺ do RS

SHBG- a globulina ligadora de hormonas sexuais

SHR- ratos espontaneamente hipertensos

SNS- sistema nervoso simpático

SOD- enzima superóxido dismutase

SRAA- Sistema renina angiotensina aldosterona

TnC- Troponina C

TnI- Troponina I

TnT- Troponina T

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

UI: unidade internacional

VE: Ventrículo esquerdo

WKY- ratos wistar Kioto

μ g: Micrograma

μ M: micromolar

%: Porcentagem

°C: graus Celsius

RESUMO

A testosterona desempenha um papel importante na função cardíaca e no funcionamento do sistema cardiovascular. Esta função pode ser realizada de forma direta, com a ação direta no cardiomiócito e nos vasos sanguíneos, ou também, via ativação do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA). Portanto, o comprometimento em sua produção, cenário comum em homens de meia idade, é caracterizado como um fator de risco para doença cardiovascular, como a redução da contratilidade miocárdica. Considerando a importante relação deficiência de testosterona e alteração da atividade do SRAA o objetivo foi investigar os efeitos do tratamento com telmisartan por 8 semanas na contratilidade de músculos papilares de ratos SHR OQT, evidenciado o papel desse fármaco na cinética do cálcio. Para isso, os animais SHR foram divididos em 5 grupos: grupo controle (Sham), orquiectomizados (OQT), tratados com o veículo, orquiectomizados tratados com telmisartan (OQT + Tel), orquiectomizados tratados com telmisartan mais antagonista do PPAR- γ (OQT + Tel + BADGE) e orquiectomizados tratados com hidralazina (OQT + Hidra). O grupo OQT apresentou redução da força de contração dos músculos papilares, que foi prevenida pelo tratamento com telmisartan e telmisartan + BADGE, de maneira similar. A resposta inotrópica ao cálcio, bem como à ativação beta adrenérgica, também foi reduzida no grupo OQT e prevenidas pelo tratamento com telmisartan. Cabe destacar que o o tratamento com telmisartan + BAGDE apresentou aumento da resposta inotrópica ao cálcio, bem como à ativação beta adrenérgica quando comparado com grupo OQT tratado com telmisartan. As contrações obtidas após pausa de 10 minutos da estimulação elétrica (pos rest contraction, PRC), que avalia indiretamente o influxo transsarcolemal, foram similares em papilares isolados de animais OQT e SHAM. No entanto, essa resposta aumentou grupo OQT tratado com telmisartan e no grupo OQT tratado com telmisartan e BADGE, sendo ainda maior neste último grupo, sugerindo que o tratamento com telmisartan foi capaz de aumentar o fluxo de cálcio transsarcolemal, independente da presença de orquiectomia. Além disso, esses resultados sugerem que quando o efeito do telmisartan é somente no bloqueio dos receptores AT1 a melhora da força é ainda maior. Um aumento da expressão da SERCA2a e do NCX foi observado no grupo OQT quando comparado ao SHAM, os quais foram prevenidos pelo tratamento com telmisartan. Além disso, o tratamento com telmisartan + BADGE preveniu o aumento da expressão da SERCA2a observada no grupo OQT, sem alterar o aumento da expressão de NCX evidenciado no grupo OQT. A expressão proteica do PLB não foi alterada no grupo OQT, mas o tratamento com

telmisartan reduziu a expressão desta proteína e a associação de telmisartan + BADGE produziu uma redução ainda maior, comparado aos demais grupos. No entanto, a expressão do PLB fosforilado foi similar em todos os grupos estudados. A expressão proteica do receptor AT1 não foi alterada pela OQT mas aumentou após tratamento com telmisartan. Juntos, os dados do presente estudo demonstram que a orquiectomia em animais hipertensos reduz a contratilidade de músculos papilares, e o tratamento com um antagonista dos receptores SRA e agonista parcial do PPAR γ (telmisartan) previne o comprometimento da resposta ao cálcio e a resposta beta adrenérgicas observado nos ratos OQT, impedindo a queda da força de contração observada. Além disso, sugere-se que a ativação do PPAR- γ pelo telmisartan atenua o influxo de cálcio transarcolemal impedindo uma possível sobrecarga de cálcio decorrente de um efeito exclusivo do telmisartan no antagonismo dos receptores AT1.

Palavras chaves: Contratilidade miocárdica; Sistema renina angiotensina; PPAR Gama; músculos papilares.

ABSTRACT

Testosterone plays an important role in cardiac function and in the functioning of the cardiovascular system. This function can be performed directly, with direct action on the cardiomyocyte and blood vessels, or also, via activation of the RAAS. Therefore, the compromise in its production, a common scenario in middle-aged men, is characterized as a risk factor for cardiovascular disease, such as the reduction of myocardial contractility. Considering the important relation testosterone deficiency and alteration of the activity of the RAAS, the objective was to investigate the effects of the treatment with telmisartan for 8 weeks on the contractility of papillary muscles of SHR OQT rats, evidenced the role of this drug in the kinetics of calcium. For this, SHR animals were divided into 5 groups: control group (Sham), orchiectomized (OQT) treated with vehicle, treated with telmisartan (OQT + Tel), orchiectomy treated with telmisartan plus PPAR- γ antagonist (OQT + Tel + BADGE) and orchiectomized rats treated with hydralazine (OQT + Hydra). OQT group showed a reduction in the contraction force of the papillary muscles that was prevented by the treatment with telmisartan and telmisartan + BADGE, similarly. Calcium inotropic response, as well as beta-adrenergic activation, were also reduced in the OQT group and prevented by treatment with telmisartan. It important to be noted that the treatment with telmisartan + BAGDE showed increased in the calcium inotropic response as well as in the beta adrenergic activation when compared to telmisartan treated OQT group. The contractions obtained after a 10-minute pause of electrical stimulation (PRC), which indirectly evaluates transsarcolemal calcium inflow, were similar in papillary of OQT and SHAM rats. However, this response increased in the telmisartan-treated OQT group and in the OQT group treated with telmisartan and BADGE, and was even higher in the latter group, suggesting that telmisartan treatment was able to increase trans-sarcolemmal calcium influx, regardless of the presence of telmisartan. orchiectomy. In addition, these results suggest that when the effect of telmisartan is only occur in AT 1 receptor blockade the strength improvement is even greater. An increase in the expression of SERCA2a and NCX was observed in the OQT group when compared to SHAM, which was prevented by treatment with telmisartan. In addition, treatment with telmisartan + BADGE prevented the increase of SERCA2a expression observed in the OQT group, without altering the increase of NCX expression evidenced in the OQT group. Protein expression of PLB was not altered in the OQT group, but treatment with

telmisartan reduced the expression of this protein and the association of telmisartan + BADGE produced an even greater reduction compared to the other groups. However, the expression of the phosphorylated PLB was similar in all groups studied. The AT1 receptor protein expression was not altered by OQT but reduced after telmisartan treatment. Together, our results demonstrate that orchiectomy in hypertensive animals reduces contractility of papillary muscles, and the treatment with an SRAA receptor antagonist and PPAR γ partial agonist (telmisartan) prevents the impairment of calcium response and beta adrenergic response observed in OQT rats, preventing the reduced of contraction force. In addition, it is suggested that the activation of PPAR- γ by telmisartan attenuates the transsarcolemal calcium influx preventing a possible calcium overload due to an exclusive effect of telmisartan on AT1 receptor antagonism.

Keyword: Testosterone; Myocardial contractility; Renin angiotensin system; PPAR Gama; papillary muscles.

1. INTRODUÇÃO

A testosterona é o principal hormônio masculino, responsável por grandes diferenças entre homens e mulheres. A testosterona tem um grande impacto na morfologia, psicologia do indivíduo, na reprodução e na sociedade. Esse hormônio não apenas controla o desenvolvimento das características sexuais do homem e as funções de reprodução como também desempenha papel determinante na sua saúde como um todo.(AYAZ; HOWLETT, 2015).

A testosterona é produzida principalmente pelos testículos nos homens, embora também possa ser produzida pelas glândulas supra-renais e outros locais, como tecido adiposo (BHASIN et al., 2010; SCHOCK et al., 2006). É responsável pela descida dos testículos para o escroto e desenvolvimento do sistema reprodutivo no feto, determinação de características sexuais secundárias masculinas e produção de espermatozoides (HORSTMAN et al., 2012; JARRAR et al., 2000).

Nos homens a biossíntese de testosterona é controlada pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (JONES; HUGH JONES; CHANNER, 2004). A sequência inicial é a produção e secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelos neurônios hipotalâmicos (NAHRENDORF, 2003). Na glândula pituitária anterior esse hormônio estimula a síntese e a secreção do hormônio luteinizante (LH) na circulação (CAVASIN et al., 2003; JONES; HUGH JONES; CHANNER, 2004). O LH liga-se aos receptores de LH nas células de Leydig, promovendo o transporte de colesterol para a mitocôndria e, assim, aumentam a ativação transcricional de enzimas que codificam genes importantes na biossíntese de testosterona (CREDIT et al., 2002a). Essa função é exercida via ativação de uma proteína G (Gs) com posterior ativação da via AMPc/proteína quinase A (PKA). Os níveis de testosterona em circulação são regulados através de um mecanismo de feedback negativo que bloqueia a liberação de GnRH e LH em decorrência de níveis de testosterona elevados. Com a redução dos níveis séricos de testosterona o colesterol nas células de Leydig é então transportado para a membrana mitocondrial interna conjuntamente com a proteína reguladora aguda esteroideogênica (StAR) (BARP et al., 2002). Já presente na porção interna da mitocôndria a cadeia lateral do colesterol é clivada pela enzima citocromo P450 (CYP) também conhecida como CYP11A1 gerando a pregnenolona (BARP et al., 2002). Quando a pregnenolona é formada, ela se difunde para o retículo endoplasmático, onde a biossíntese da testosterona prossegue através das vias Δ^4 e Δ^5 . Por último, parte da testosterona produzida é transformada no

andrógeno, di-hidrotestosterona (DHT) mais potente, pela 5 α -redutase (SIWIK; PAGANO; COLUCCI, 2001).

No sangue, a testosterona existe tanto na forma livre como ligada a proteínas (JUUL; SKAKKEBAEK, 2002). A porção maior (60%) da testosterona é transportada pela maior proteína responsável pelo transporte de testosterona, a globulina ligadora de hormonas sexuais (SHBG), sendo a outra porção restante ligada à albumina (38%), e na forma livre pela circulação (2%), sendo capaz de entrar nas células e exercer os seus efeitos (KARILA, 2003). A testosterona age então atravessando a membrana plasmática e ligando-se à receptores citoplasmáticos próprios para então iniciar reações químicas em cascata no citosol por meio de proteínas (POCOCK G, 2006). A ligação dos receptores com o hormônio, atua no núcleo proporcionando a síntese de mRNA e no citosol possibilitando síntese de proteínas envolvidos na ação hormonal.

Os receptores androgênicos estão presentes em vários órgãos como, fígado, rim, cérebro, músculo esquelético, coração, e em células endoteliais e células musculares lisas, assegurando aos andrógenos a capacidade de modular a função de uma variedade de tecidos. A produção da testosterona nos homens começa no útero, aumenta ativamente na puberdade e decai com o avançar da idade (GOLDEN et al., 2004a; HORSTMAN et al., 2012). Com o envelhecimento ocorre diminuição gradativa na concentração sérica dos hormônios sexuais masculinos, sendo que nas faixas etárias mais avançadas a testosterona é reduzida em, aproximadamente, 20% dos indivíduos (MORALES; HEATON; CARSON, 2000). A deficiência na síntese da testosterona, tem sido definida como uma variedade de sinais e sintomas específicos que inclui: prejuízo no desenvolvimento sexual, disfunção sexual, ginecomastia, atrofia testicular, infertilidade e fraturas ósseas, problemas de atenção, sono, e humor depressivo (BHASIN et al., 2010). Esse prejuízo na produção da testosterona dependente da idade não se limita aos humanos, como também é constatado em ratos e camundongos mais velhos (acima de 20 meses de idade) em conjunto com uma queda na fertilidade (JAMES, Andrew F; CHOISY; HANCOX, 2007; JONES et al., 2002).

1.1 Testosterona e o sistema cardiovascular.

A presença dos receptores androgênicos em órgãos do sistema cardiovascular mostra que a testosterona possui a capacidade de modular a função desse sistema. Os hormônios esteroides atuam no sistema cardiovascular por meio de mecanismo genômico e por meio de acoplamentos com receptores citoplasmáticos e de membrana, promovendo várias alterações a nível membranar e modulando a sinalização celular (GOLDEN et al., 2004a). A ativação das vias não genômicas no sistema cardiovascular é responsável pelas respostas rápidas dos androgênicos presentes nesse sistema (MALKIN et al., 2004). Um exemplo é o efeito da testosterona no rápido relaxamento das grandes artérias e nas artérias de resistência pela inibição do canal de cálcio tipo L e ativação dos canais do K no músculo liso (RAMBOURG; SEGRETAIN, 1980).

A deficiência de testosterona pode ocasionar redução no trofismo cardíaco, diminuição da expressão de receptores androgênicos, canais de íons $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, canais de cálcio de tipo "L", canais de K, receptores β_1 - adrenérgicos (GOLDEN et al., 2003; GOLDEN; MARSH; JIANG, 2002; JAMES, Andrew F; CHOISY; HANCOX, 2007), mudanças nas proporções das subunidades das cadeias pesadas de miosina (MHC) (GOLDEN et al., 2004a) e disfunção diastólica e sistólica (SCHAIBLE et al., 1984), com implicações importantes na contratilidade miocárdica e na atividade elétrica do coração (BIDOGGIA et al., 2000). Outrossim, estudo mostra a relação entre o tratamento com testosterona e uma diminuição da formação de placas ateroscleróticas na aorta de ratos (HAYWARD; KELLY; COLLINS, 2000). Além disso, estudos em animais mostraram que a testosterona pode induzir relaxamento do músculo liso vascular por mecanismos dependentes e independentes do endotélio (CHOU et al., 1996; YUE et al., 1995). Os efeitos da testosterona ainda incluem a redução de isquemia ao esforço quando aplicada agudamente em humanos com doença coronariana prévia (ENGLISH et al., 2000), prevenção do remodelamento miocárdico patológico em modelos experimentais (NAHRENDORF, 2003) e propriedades anti-inflamatórias (CREDIT et al., 2002a) e antioxidantes (BARP et al., 2002) pela diminuição citocinas pro-inflamatório no miocárdio (CREDIT et al., 2002a) e aumento de superóxido dismutase cardíaca (um importante elemento do sistema antioxidante celular) (BARP et al., 2002). No entanto, estudos já comprovam uma importante relação da testosterona com o aparecimento da hipertensão, principal fator de risco para as doenças cardiovasculares. Esses estudos já demonstram que a pressão arterial é maior em homens do que em mulheres da mesma idade, e que a manifestação da hipertensão é mais rápida, podendo ser mais grave em homens

comparado com as mulheres (KOTCHEN; MCKEAN; KOTCHEN, 1982; REGITZ-ZAGROSEK et al., 2010).

1.1.1 Hipertensão arterial.

De acordo com a Sociedade Brasileira de Hipertensão (2010), a hipertensão arterial (HA) é uma doença crônica, poligênica e de causas multifatoriais, com acometimentos funcionais, estruturais e metabólicos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO (SBH), 2010). É um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade, afetando mais de 75 milhões de pessoas. (Center for Disease Control, 2017). Desses hipertensos cerca de 50% estão entre as idades de 60 e 69 anos (DÓREA, E.L.; LOTUFO, 2004).

A HA é um dos principais fatores de risco para as doenças cardiovasculares como o infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca congestiva, doença renal terminal e doença vascular periférica (FIEBACH et al., 1989; MACMAHON et al., 1990; STAMLER; STAMLER; NEATON, 1993; WHELTON et al., 1992; WHELTON PK, 1994), que nos últimos dez anos representaram as principais causas de mortalidade em todo o mundo (PEREIRA et al., 2009). No Brasil, aproximadamente 28% dos mortes são decorrentes de doenças cardiovasculares.(V DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2006). Fatores como a idade, sexo, raça, sobrepeso ou obesidade e práticas pouco saudáveis como sedentarismo, consumo excessivo de bebidas alcoólicas, tabagismo e consumo exagerado de sal podem contribuir para o aparecimento dessa doença (NATIONAL HEART, LUNG, 2015).

Pacientes hipertensos podem apresentar modificações estruturais e funcionais cardíacas, como hipertrofia e disfunção sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo, prejuízo da capacidade de reserva sanguínea coronariana, aumento do átrio e da aorta, repolarização ventricular prolongada e arritmias (LEONETTI; CUSPIDI, 1995; MITCHELL et al., 2007; SEGA et al., 2001).

1.1.2 Deficiência de testosterona e hipertensão arterial

A deficiência de testosterona normalmente decorre na meia idade e em homens mais velhos (DARIUSH MOZAFFARIAN et al., 2016). Ela pode acontecer também, em homens mais jovens com desordem hipófise-hipotálamo ou testiculares (YEAP, 2010). Tal deficiência vêm acompanhada de vários sinais e sintomas específicos, como citados anterior.

Estudos epidemiológicos e clínicos demonstraram um papel importante do sexo na fisiopatologia da hipertensão e da hipertrofia cardíaca. Um exemplo disso, são estudos que mostram que a ocorrência e a gravidade da hipertensão têm se revelado maiores em homens do que em mulheres na pré-menopausa (KOTCHEN; MCKEAN; KOTCHEN, 1982; REGITZ-ZAGROSEK et al., 2010). Além disso, foram demonstradas diferenças sexuais na hipertensão e hipertrofia cardíaca em modelos genéticos e induzidos, incluindo ratos sensíveis ao sal de Dahl (DS) (ROWLAND; FREGLY, 1992), hipertensão do acetato de desoxicorticosterona (CROFTON; SHARE, 1997), ratos espontaneamente hipertensos (RECKELHOFF, 2001), dois rins um clip (HAYWOOD JR, 1997) e hipertensão programada no útero (GRIGORE; OJEDA; ALEXANDER, 2008; SATHISHKUMAR et al., 2012). Nestes animais, a hipertensão desenvolveu-se mais rápida e mais séria em machos comparados com ratos fêmeas.

Segundo NHANES III, Terceiro Levantamento Nacional de Avaliação de Saúde e Nutrição, os homens têm pressão arterial mais elevada do que as mulheres até a meia idade. Em um outro estudo realizado por Wiinberg e colaboradores, 1995, foi demonstrado que a pressão sanguínea aumenta com o envelhecimento tanto em homens quanto em mulheres, porém os homens apresentaram médias mais altas de pressão arterial diária, aproximadamente 6 a 10 mm Hg, do que as mulheres, até a idade de 70 a 79 anos, quando a pressão arterial era idêntica para homens e mulheres (WIINBERG et al., 1995). Este estudo foi realizado em 352 homens e mulheres normotensas dinamarqueses, com idade entre 20 a 79 anos. Khoury e colaboradores, 1992, também demonstram em uma monitorização ambulatorial da pressão arterial em 131 homens e mulheres, com idades entre 50 e 60 anos, que os homens possuem a pressão arterial mais alta do que as mulheres (KHOURY et al., 1992). Ademais, Anastos K e colaboradores, 1991, demonstram ainda que a incidência de hipertensão não controlada também é maior em homens que em mulheres (ANASTOS et al., 1991). As diferenças relacionadas ao sexo na pressão arterial em seres humanos também foram documentadas em vários modelos animais. Em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), por exemplo, ratos machos têm a pressão arterial maior do que ratas de idade similares (GANTEN U, SCHRODER G, WITT M, ZIMMERMAN F, GANTEN D, 1989; MASUBUCHI et al., 1982).

Apesar dos mecanismos responsáveis pelas diferenças de sexo no controle da pressão arterial não sejam claros, há indícios consideráveis de que andrógenos, como a testosterona, exercem um papel relevante nas diferenças associadas ao sexo na regulação da pressão arterial. Um desses indícios veio de estudos empregando técnicas

de monitorização ambulatorial da pressão arterial em crianças. Esses estudos demonstram que com o aumento da idade, a pressão arterial aumenta de igual forma tanto em meninos quanto em meninas. No entanto, após o início da puberdade, os meninos têm pressão arterial mais alta do que as meninas da mesma idade (BACHMANN et al., 1987; HARSHFIELD et al., 1994). Na faixa etária de 13 a 15 anos, a pressão arterial sistólica foi de aproximadamente 4 mmHg maior nos meninos do que nas meninas e, entre 16 e 18 anos, os meninos possuíram pressões sistólicas mais elevadas que as meninas de 10 a 14 mmHg. Esses dados salientam que na adolescência e na puberdade, quando os níveis de andrógenos estão elevados, a pressão arterial é maior nos meninos do que nas meninas.

Outras evidências de que a testosterona pode desempenhar um papel importante na hipertensão nos homens, vieram de estudos que demonstram o efeito da deficiência da testosterona, pela castração de animais e também pelo aumento nos níveis de testosterona mediante algumas condições fisiopatológicas ou tratamento de testosterona exógena crônica. Estes estudos demonstraram que a castração em idade jovem (3 a 5 semanas) atenua o desenvolvimento de hipertensão em SHR e em ratos submetidos à manobra de 2 rins 1 clipe (CHEN; MENG, 1991; GANTEN U, SCHRODER G, WITT M, ZIMMERMAN F, GANTEN D, 1989; IAMS; WEXLER, 1977; MÁLYUSZ; EHRENS; WRIGGE, 1985; MASUBUCHI et al., 1982; ROWLAND; FREGLY, 1992).

Da mesma forma, outros estudos demonstram que o aumento de testosterona atestado em situações como ovário policístico e tumores virilizantes na adrenal é capaz de provocar hipertensão em mulheres (MATTSSON et al., 1984; SORANNO D, PRASAD V, OBERFIELD DR, GRECO A, SIVARAMAN N, 1999). Além disso, o tratamento com testosterona crônica de ratos normotensos e com doença renal aumenta a pressão arterial, o que não foi reversível, dependendo do tempo de duração da testosterona dada, demonstrando assim que, aumentos nos andrógenos em humanos e em ratos normotensos e hipertensos levam a uma pressão arterial mais alta (COLBY; SKELTON; BROWNIE, 1970; OUDAR et al., 1991). Outrossim, estudos mostram que a testosterona possui efeito sobre a relação pressão-natriurese. A relação pressão-natriurese refere-se ao fato de que o aumento da pressão arterial promove um aumento acentuado na excreção de sódio pelos rins. Em situações como, aumento de longo prazo na pressão arterial ou hipertensão ocorre como resultado uma redução na função excretora renal ou uma atenuação na relação pressão-natriurese, o que culmina com uma retenção de sódio com implicações importantes na volemia (HALL JE, BRANDS MJ, 1999; HALL JE, GUYTON AC, 1995). Um desses estudos que criam evidências que a testosterona possui

efeito sobre a pressão-natriurese foi realizado por Curtis e colaboradores, 1983, que demonstraram que a pressão arterial retorna ao normal em pacientes hipertensos que recebem rins de dadores normotensos, o que indica que rins de hipertensos possuem alterações que podem desempenhar um papel determinante na patogênese da hipertensão. Já o estudo de Reckelhoff JF e colaboradores, 1998, demonstraram que a relação pressão-natriurese é diminuída em ratos SHR machos comparados com fêmeas (RECKELHOFF; ZHANG; GRANGER, 1998). Neste mesmo estudo a castração dos SHR machos restaurou a relação pressão-natriurese, enquanto a ovariectomia de SHR não teve esse efeito. Nesse estudo foi demonstrado de forma semelhante que o tratamento de SHR fêmeas ovariectomizadas com testosterona resultou em um aumento nos níveis pressóricos e uma concomitante redução da relação pressão-natriurese. Tendo em conta que já foi constatado a presença dos receptores androgênico nos segmentos tubulares proximais do néfron, esse estudo reforça a ideia de que os andrógenos podem ter um efeito direto sobre a reabsorção de sódio (HENNINGTON BS, HENEGAR L, SINNING AR, GRANGER JP, 1997). E ainda cria mais evidência que a testosterona seja o fator decisivo dos machos apresentarem uma relação pressão-natriurese diminuída e maiores valores de pressão sanguínea.

O desenvolvimento da hipertensão é complexo e está associado à alteração de uma ampla gama de sistemas. Entretanto, algumas linhas de evidência sugerem que a ativação do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) desempenha um papel importante na gênese e manutenção da hipertensão arterial essencial (HALL JE, BRANDS MJ, 1999; HALL JE, GUYTON AC, 1995; JAMES, G D et al., 1986; RAJAGOPALAN et al., 1996). O papel do sistema SRAA a nível cardiovascular e renal é mediado pela produção ou ativação de diversos fatores de crescimento e substâncias vasoativas, acarretando vasoconstrição e hipertrofia celular (VALLOTTON MB., 1987). Trabalhos da literatura já demonstram uma relação entre hormônios sexuais e sua interação com o SRA na regulação da função cardiovascular e pressão arterial (KOMUKAI; MOCHIZUKI; YOSHIMURA, 2010; OS et al., 2008).

Assim, para maior compreensão das relações entre SRAA e testosterona, uma breve explicação sobre a ativação e mecanismos de ação deste sistema se faz necessário.

1.2 Sistema Renina-Angiotensina

Um dos mecanismos de controle da pressão arterial é a ação do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), que teve seu mecanismo fisiológico melhor compreendido nos últimos vinte anos em situações fisiopatológicas como a hipertensão (BARRETOS-CHAVES MLM, 2012; SHAH et al., 2001).

A via clássica de ação do SRAA se inicia com a síntese da renina nas células justaglomerulares renais e secretadas para a circulação sistêmica em resposta a estímulos como queda da pressão de perfusão na arteríola aferente renal, diminuição da liberação de cloreto de sódio para as células da mácula densa e estímulo beta-adrenérgico (SHAH et al., 2001).

Quando liberada para a circulação, a renina converte o angiotensinogênio, produzido principalmente nos hepatócitos, em angiotensina I na circulação sanguínea. Em seguida, um novo componente deste sistema, a Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) metaboliza a angiotensina I em angiotensina II (Angio II), o principal hormônio deste sistema. A ECA é expressa amplamente nas membranas das células endoteliais pulmonares e o produto de sua ação, a Angio II é responsável por todos os efeitos periféricos associados ao sistema clássico (BARRETOS-CHAVES MLM, 2012). Dentre esses efeitos, destacam-se a vasoconstrição (o qual constitui-se na ação aguda da Ang II), aumento da reabsorção de sódio pelos rins (efeito mediado tanto por ação direta, como indiretamente através da liberação de aldosterona), proliferação celular e hipertrofia vascular, participando, portanto, da regulação da pressão arterial, função cardíaca e vascular. Todas essas ações são mediadas, principalmente, a partir da ligação da Ang II ao receptor AT1 (AT1R), acoplado à proteína G (DE GASPARO et al., 2000). No entanto, também é importante destacar que outro receptor, AT2 (AT2R), também pode mediar algumas ações induzidas pela Ang II. O AT2R é expresso durante o desenvolvimento fetal, porém drasticamente reduzido após o nascimento. Portanto, em condições fisiológicas, a Ang II age, preferencialmente, em AT1R.

A via de ação clássica tem sido o foco para a utilização de duas classes de medicamentos empregados amplamente no controle de doenças cardiovasculares como a hipertensão arterial, insuficiência cardíaca e hipertrofia cardíaca: os inibidores da ECA e os antagonistas específicos do receptor AT1.

Além deste mecanismo de formação de componentes e estímulos, existe uma via não clássica de ação do SRAA com componentes que apresentam, em muitas vezes, funções fisiológicas antagônicas aos efeitos da Angio II. Um dos componentes dessa via não clássica é a ECA 2, que degrada a Angio I em Angio (1-9) e a Angio II em Angio (1-7) (LOOT et al., 2002). A Angio (1-7) possui um receptor acoplado a proteína G, o receptor

MAS, descrito no início do século XXI e que se encontra expresso nos rins, coração e vasos, no cérebro e nos testículos. Esse receptor parece agir de forma similar à do receptor AT2 da Angio II, desempenhando efeitos contrários a proliferação celular e, principalmente, de vasodilatação (BROSNIHAN; LI; FERRARIO, 1996; LOOT et al., 2002).

Ademais, embora os componentes do SRA circulantes possam ser absorvidos pelos tecidos, em alguns locais como glândulas adrenais, rins, coração, vasos e cérebro ocorre a síntese de Angio II, configurando o SRA local ou tecidual. O SRA é caracterizado pela presença de componentes necessário a síntese de Angio II, até receptores e proteínas sinalizadoras que medeiam as ações intracelulares (GRIENGLING; MURPHY; ALEXANDER, 1993). O SRA tecidual desempenha um papel importante em algumas condições patológicas, já que a Angio II gerada intracelularmente, além de contribuir para os seus níveis extracelulares ou teciduais, age de maneira parácrina e/ou autócrina.

A ativação do SRAA tem participação no remodelamento estrutural e funcional do coração (PENDERGRASS et al., 2008). A Ang II atua sobre os receptores AT1, que ativam a cascata da MAP Quinase, aumentando a síntese proteica no miócitos e promovendo o crescimento celular (hipertrofia miocárdica). A angiotensina II, também leva a produção de colágeno e fibrose intersticial via ativação de TGF-beta e ativa as Matrix metalloproteinases (MMPs), que desfazem as pontes cruzadas entre as fibras de colágeno, alterando sua estrutura e levando à dilatação miocárdica (HEIN et al., 2003; WOODIWISS et al., 2001).

Na hipertensão, o SRAA pode apresentar sua atividade aumentada e estes efeitos exarcebados, contribuindo para várias alterações funcionais e estruturais em vários órgãos-alvo. A angiotensina II pode provocar dano vascular por induzir vasoconstrição, proliferação e hipertrofia de células musculares lisas e inflamação vascular, bem como degradação da matriz extracelular (SANTOS; KRIEGER; PEREIRA, 2012; THIEME et al., 2017). Muitos estudos demonstram também que níveis elevados circulantes e teciduais de Ang II são estímulos importantes para aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e elevar a expressão de citocinas pró-inflamatórias que potencializam o estresse oxidativo e contribuem para o desenvolvimento e manutenção da hipertensão (RAJAGOPALAN et al., 1996; SILVA et al., 2017; USHIO-FUKAI et al., 1996).

Por fim, a Angio II estimula a síntese e secreção de aldosterona que também apresenta um papel importante na indução de formação de colágeno, fibrose e remodelamento cardíaco (MIZUNO et al., 2001). Além disso, SRAA controla a função e morfologia cardíaca por meio da regulação na liberação de noradrenalina (NA) pelos

terminais nervosos simpáticos (ESCHENHAGEN et al., 1992). Por conseguinte, a hiperatividade do SRAA, observada em algumas fisiopatologias, pode resultar em uma maior síntese e liberação de noradrenalina pelos terminais nervosos simpáticos. Esta situação contribui para uma hiperatividade simpática, que pode levar a aumento de contratilidade observada, por exemplo, na hipertrofia cardíaca e hipertensão (KAWAI et al., 1999).

Como mencionado acima, o papel do sistema SRAA a nível cardiovascular e renal é mediado pela produção ou ativação de diversos fatores de crescimento e substâncias vasoativas, acarretando vasoconstricção e hipertrofia celular (VALLOTTON MB., 1987). Trabalhos da literatura já demonstram uma relação entre hormônios sexuais e sua interação com o SRA na regulação da função cardiovascular e pressão arterial (KOMUKAI; MOCHIZUKI; YOSHIMURA, 2010; OS et al., 2008). Em um desses trabalhos foi demonstrado que a atividade da renina plasmática é maior em homens do que em mulheres. Esse trabalho foi realizado em homens e mulheres num período de 9 anos, onde foi constatado um aumento de 27% na atividade da renina plasmática em homens do que em mulheres, independentemente da idade e da herança étnica (JAMES, G D et al., 1986). Em um outro trabalho, Schunkert H e colaboradores 1997, demonstraram que a atividade da renina plasmática é maior em mulher pós-menopausa do que em mulher na pré-menopausa, mas que ainda essa atividade da renina plasmática é maior em homens do que mulheres de idades semelhantes (SCHUNKERT H, DANSER AHJ, HENSE H-W, DERKX FHM, KURZINGER S, 1997).

De igual forma, essa diferença na atividade da renina plasmática também foi demonstrada em estudos com animais. J.F. Reckelhoff, L.A e colaboradores 2000, demonstram em estudo que analisou o efeito do sexo na resposta ao tempol, um mimético da SOD na pressão arterial de SHR, que atividade da renina plasmática é maior nos SHR macho do que as ratas SHR fêmeas. Ainda nesse estudo, foi demonstrado que o efeito do tempol na redução da pressão arterial era maior nos machos do que nas fêmeas, fundamentando a participação do estresse oxidativo e o SRAA na mediação da pressão arterial nos ratos SHR machos (RECKELHOFF JF, FORTEPIANI LA, ZHANG H, SRIVASTAVA K, 2000). Katz FH e colaboradores 1997, demonstraram, igualmente, que o tratamento com a testosterona em ratos Sprague-Dawley orquiectomizados pode aumentar a atividade e a concentração da renina plasmática (KATZ; ROPER, 1977).

Em estudo de Reckelhoff JF e colaboradores 1998, mostram que há uma ligação entre o nível de testosterona sérica, atividade da renina plasmática e a pressão arterial em ratos Sprague-Dawley tratados cronicamente com doses crescentes de testosterona

(RECKELHOFF; ZHANG; GRANGER, 1998). E por último, Ellison KE e colaboradores 1989, demonstraram que ratos da linhagem WKY machos possuem mRNA renal do angiotensinogênio maior do que WKY fêmeas. Este estudo demonstrou que nos machos WKY, o nível de mRNA renal de angiotensinogênio diminuiu em 60% como resultado da castração e foi restaurado pela administração de testosterona. Nos animais WKY fêmeas apesar da quantidade extremamente baixo de mRNA de angiotensinogênio renal, o tratamento com testosterona ocasionou um aumento nos nível de expressão no rim que foi análogo ao do homem adulto (ELLISON et al., 1989). Esse mesmo comportamento foi corroborado por Chen Y-F e colaboradores 1992, onde foi demonstrado que a pressão arterial, a atividade da renina plasmática e os níveis de mRNA do angiotensinogênio hepático foram maiores nos machos do que nas fêmeas. A orquiectomia tardou o desenvolvimento da hipertensão e reduziu os níveis de renina plasmática e de RNAm do angiotensinogênio renal e hepático, e a reposição de testosterona recuperou a renina plasmática e aumentou o RNAm do angiotensinogênio renal e hepático. A ovariectomia não alterou a pressão arterial ou a renina plasmática, mas diminuiu a renina renal e o mRNA do angiotensinogênio renal e hepático, a testosterona aumentou a pressão sanguínea, a renina plasmática, a renina renal e o RNAm do angiotensinogênio, e os níveis de RNAm do angiotensinogênio hepático em fêmeas ovariectomizadas (CHEN; NAFTILAN; OPARIL, 1992). Além do mais, foi demonstrado que nos homens há predominância da expressão dos componentes clássicos do SRA Ang II e AT1R e níveis mais baixos de AT2R do que as mulheres (MISHRA; HANKINS; KUMAR, 2016; SULLIVAN et al., 2010). Há evidência de que na presença da testosterona há um aumento da relação AT1R/AT2R com um aumento na expressão dos receptores AT1 e uma redução na expressão dos AT2R (MISHRA; HANKINS; KUMAR, 2016).

Assim sendo, esses estudos criam mais evidências que a testosterona estimula o SRAA e fortalecem a crença de que esse sistema possa exercer um papel na mediação da diferença de gênero na regulação da pressão arterial. Embora não seja ainda conhecido o mecanismo pelo qual a testosterona aumenta a atividade da renina plasmática, algum desses estudos dão o suporte que esse possa ser devido a aumento do angiotensinogênio hepático e renal e assim levando um aumento de angiotensina II, segundo a figura 1:

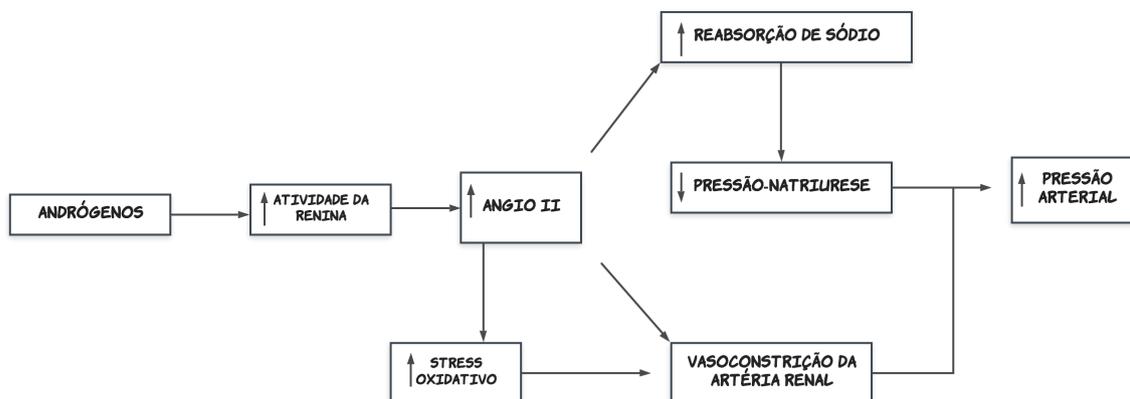


Figura 1: Figura esquemática pelo qual os andrógenos poderiam afetar o SRAA causando um incremento na pressão arterial. Nota-se que ao que tudo indica os andrógenos aumentam a atividade de renina que leva a um aumento na quantidade de angiotensina II circulante. Essa Angio II aumentada medeia ações como aumento do estresse oxidativo, vasoconstrição da artéria renal e aumento da reabsorção de sódio levando ao um aumento da pressão arterial. O aumento na reabsorção de sódio causa uma atenuação da pressão-natriurese contribuindo mais ainda para o aumento da PA (RECKELHOFF JF, FORTEPIANI LA, ZHANG H, SRIVASTAVA K, 2000).

No nosso trabalho foi analisado a interrelação entre hipertensão essencial, sistema renina angiotensina e deficiência de testosterona, mencionado acima, sobre a função cardíaca. Para mimetizar a hipertensão essencial humana, alguns modelos animais são usados. Dentre esses modelos, de especial interesse para o presente trabalho, se encontra os ratos com hipertensão espontânea (SHR), um modelo genético de hipertensão, desenvolvido por Okamoto e Aoki (OKAMOTO; AOKI, 1963). Esse modelo de hipertensão, desde o seu desenvolvimento, está entre os modelos mais estudados na literatura pela proximidade da sua fisiopatogenia com a hipertensão essencial (primária) do homem (TRIPPODO; FROHLICH, 1981).

Assim, para melhor compreensão do modelo de hipertensão experimental utilizado neste estudo, uma breve explicação do mesmo é necessária.

Os animais SHR, via de regra, iniciam o desenvolvimento de hipertensão em torno de 5 semanas de vida (YAMORI Y, 1984). Entre a 7^a e a 15^a semanas, esses animais já possuem um nível de pressão considerado como hipertensão, e entre a 20^a e 28^a semanas, a hipertensão atinge um platô (YAMORI Y, 1984). Em SHR adulto, a hipertensão é frequentemente associada a um aumento da resistência periférica total e um débito cardíaco normal ou diminuído (POTTS; MCKEOWN; SHOUKAS, 1998).

No SHR, entre 18-24 meses de idade, a hipertensão é uma das principais causas de remodelamento cardíaco em longo prazo, que evolui gradualmente da hipertrofia compensatória do ventrículo esquerdo para a insuficiência cardíaca (DIWAN; DORN, 2007; DRAZNER, 2011). Essa transição da hipertrofia cardíaca compensada para a insuficiência cardíaca descompensada é caracterizada por várias modificações miocárdicas, como perda e disfunção de cardiomiócitos, fibrose intersticial, mudanças nos transientes de cálcio intracelular, e ativação inflamatória (DIWAN; DORN, 2007; LAROUUMANIE et al., 2014). O débito cardíaco continua em níveis normais com o avanço da hipertensão, até que nas etapas finais a função cardíaca começa a ser comprometida, quando, então, o débito cardíaco começa a reduzir-se em função de uma insuficiência cardíaca congestiva (FROHLICH, 1977).

Já é estabelecido a importância dos fatores neurais e do envolvimento do SRA no desenvolvimento e manutenção da hipertensão no SHR. Já tem sido descrito na literatura a interação entre os sistema nervoso simpático (SNS) e SRA pela ativação recíproca entre os dois sistemas (COHN et al., 1984) e isso é constatado o modelo SHR. Este sistema de feedback positivo ocorre por meio da facilitação da liberação da noradrenalina pela ativação dos receptores de Ang II, mais especificamente dos receptores AT1. Além disso, há indícios da presença dos componentes do SRA nos terminais nervosos simpáticos, com possibilidade de formação de Ang II pela ativação do SRA local que colabora para uma hiperativação do SNS (LEVI et al., 2002).

No presente trabalho foi usado ratos SHR com 3 meses de idade. Nessa idade, essa linhagem de ratos pode desenvolver hipertensão arterial de forma compensada (DOGGRELL; BROWN, 1998). Conjuntamente a isso, foi realizada a orquiectomia bilateral. Nossa proposta é mimetizar um modelo experimental que nos permite avaliar o efeito da interação deficiência de testosterona com o SRA na contratilidade de músculos papilares isolados, a partir de um modelo cujo SRA já esteja contribuído para o aparecimento de efeitos deletérios importantes, que é caso da hipertensão.

Portanto, como a proposta do presente estudo visa avaliar a contratilidade de músculos papilares isolados de ratos SHR orquidectomizados tratados com telmisartan, uma breve descrição da contratilidade cardíaca faz-se necessário.

1.3 Acoplamento excitação-contração cardíaca

O termo acoplamento excitação-contração cardíaca (AEC) refere-se ao mecanismo pelo qual o potencial de ação (PA) provoca a contração das miofibrilas (figura 2) (BERS,

2002). No miocárdio, o AEC inicia-se com o PA, que, ao excitar uma célula, promove o aumento de cálcio mioplasmático, fazendo sua concentração passar de 10^{-7} M no repouso até 10^{-5} M durante a contração. O impulso elétrico gerado nos átrios, dispara o potencial de ação que se propaga através dos cardiomiócitos, por meio de junções comunicantes em virtude da baixa resistência elétrica das mesmas e da diferença de potencial elétrico.

Durante a fase de despolarização, em virtude da entrada de Na^+ , o potencial, que era de -80 mV em repouso, atinge aproximadamente -40 mV que culmina com a abertura de canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem do tipo L, principalmente na região do túbulo T (BERS, 2002). Este aumento de permeabilidade cria uma corrente de Ca^{2+} que ocorre durante o platô do PA. Esse influxo transarcolema de cálcio promove a abertura dos receptores de rianodina (RyRs), em que grandes quantidades desse íon são liberadas do RS, um processo denominado liberação de Cálcio induzida por Cálcio (BERS; SHANNON, 2013; BERS, 2002).

O cálcio presente no citoplasma se associa às proteínas contráteis, dispostas em sarcômeros, para promover a contração. Os sarcômeros são unidades compostas por filamentos finos (actina) e grossos (miosina) que se arranjam linearmente no miócito formando a miofibrila.

Os filamentos finos são compostos por actina, tropomiosina e troponina, sendo as últimas responsáveis por controlar a contração. Uma tropomiosina se liga a sete monômeros de actina, bloqueando os sítios de interação onde a miosina se liga. A troponina é um complexo proteico formado por três subunidades: a Troponina I (TnI), Troponina T (TnT) e Troponina C (TnC) que articula a interação actina-miosina. A TnC apresenta ao Ca^{2+} que quando coupados, promovem uma alteração conformacional nesta proteína e permitem a ativação da ATPase miosínica pela actina.

O filamento grosso, ou miosina, é composto por duas cadeias pesadas, 4 leves e duas regiões em forma de dobradiça. A cabeça da miosina possui regiões de elevada atividade ATPásica dependente de Ca^{2+} e alta afinidade pela actina. Quando a cabeça da miosina estabelece pontes cruzadas com a actina e deslizam sobre ela, promovendo o encurtamento do sarcômero, ocorre a contração. Para que isto ocorra é necessário que o Ca^{2+} se ligue à Tn C, para exposição dos sítios de ligação actina-miosina, iniciando a contração (BERS, 2002).

A força com que esta contração ocorre pode ser modulada de acordo com dois principais estímulos. O primeiro deles, inerente ao próprio coração, é o estiramento das fibras ventriculares, de acordo com a Lei de Frank- Starling. (STARLING; VISSCHER,

1927). Quando as fibras ventriculares são estiradas, ocorre a abertura de canais de Ca^{2+} da membrana sensíveis a estiramento, aumento da área de interação entre actina e miosina, exposição do quarto sítio de ligação de Ca^{2+} da TnC e aumento da concentração de Ca^{2+} no sarcômero (CALAGHAN; BELUS; WHITE, ; FUCHS; SMITH, 2001).

O segundo mecanismo de modulação da força desenvolvida numa contração é o transiente de Ca^{2+} envolvido nela, que pode ser influenciada pela estimulação simpática, com a ligação da adrenalina a receptores β - adrenérgicos que estão acoplados à proteína G, estimuladora da adenilato ciclase, formando AMPc. Por sua vez, o AMPc é estimulador da fosforilação canais de Ca^{2+} e aumenta o influxo através da membrana. Além disso, estimula a fosforilação do RyR aumentando liberação de Ca^{2+} do RS e ainda está associado à ativação do PLB, aumentando da velocidade de relaxamento (efeito lusitrópico positivo).

Outrossim o relaxamento acontece quando o Ca^{2+} desliga-se da troponina C e a concentração do cálcio mioplasmático é reduzida. Em ratos, participa dessa redução do cálcio disponível no citoplasma a SERCA 2a que recapta o Ca^{2+} para o RS, o trocador $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ sarcolemal (NCX) pela extrusão do cálcio para o meio extracelular e mitocôndria. E ainda, a atividade da SERCA 2a é regulada pelo fosfolambam (PLB). Para iniciar o relaxamento, o PLB é fosforilado, o que tira a inibição da SERCA proporcionando a importação de Ca^{2+} para o RS (BERS; SHANNON, 2013).

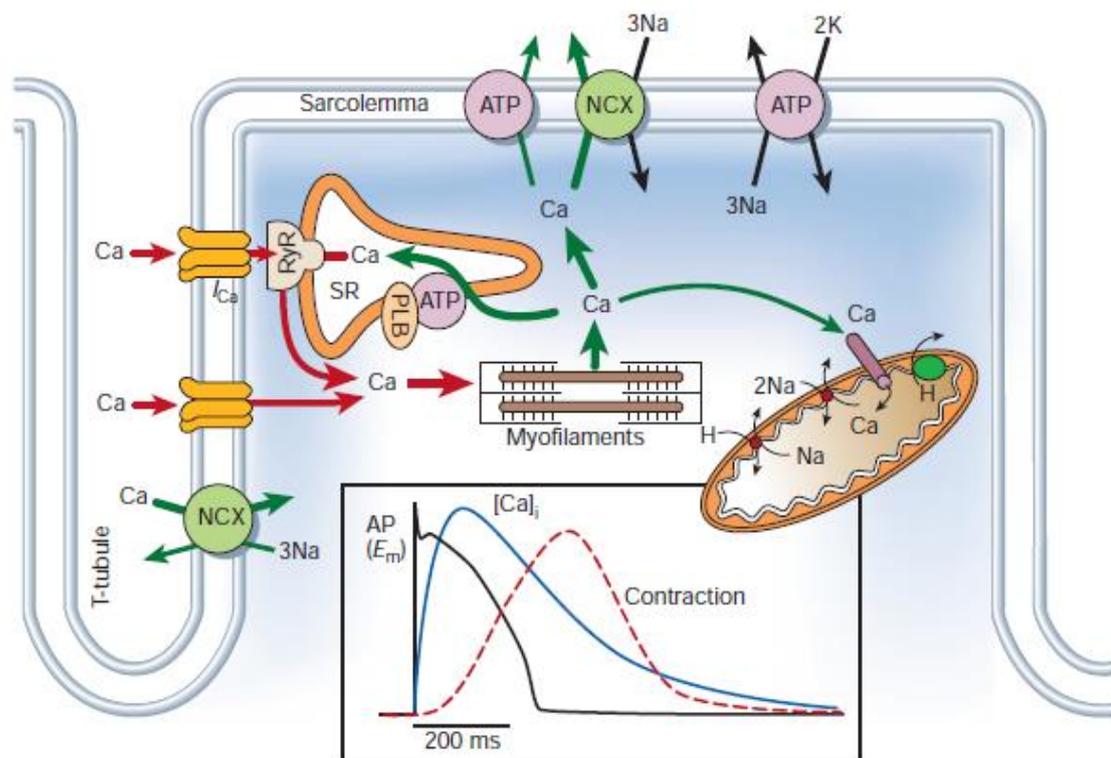


Figura 2. Representação do processo de acoplamento excitação-contrção do músculo cardíaco. SR: retículo sarcoplasmático, ATP: ATPase, PLB: fosfolamban, NCX: trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, RyR: receptor de Rianodina, AP: potencial de ação, I_{Ca} : corrente de Ca^{2+} . Bers, 2002.

Como forma de avaliar a participação do SRA na contratilidade de músculos papilares isolados de ratos SHR oquidectomizados, propomos o uso do telmisartan, um dos mais novos antagonistas de receptores AT1 e agonista parcial dos PPAR- γ , que pode lhe conferir alguns benéficos.

Assim, para compreensão dos mecanismos relacionados a via dos PPAR, uma breve descrição dos mesmos se faz necessária.

1.4 Os PPARs.

PPARS (receptores ativados por proliferadores de peroxissoma) são receptores nucleares que funcionam como fatores de transcrição, diferenciados de acordo com a distribuição nos tecidos e sua função metabólica. (MANGELSDORF et al., 1995). O nome PPAR se deve ao fato da ativação do PPAR α , primeiro receptor descoberto provocar a proliferação de peroxissomos em hepatócitos de roedores (MURPHY, G. J.; HOLDER,

2000). PPARs funcionam como sensores metabólicos: apresentam uma variedade de ligantes como ácidos graxos e esteróides, hormônio tireoideano, vitamina D e ácido retinóico e atuam na expressão de genes que promovem ações associadas à homeostase lipídica e energética, atuando fundamentalmente na oxidação de ácidos graxos, diferenciação de adipócitos e sensibilidade à insulina. Por conta desta característica, também são usados como alvos terapêuticos de fármacos utilizados no tratamento do diabetes e dislipidemias (FEIGE et al., 2006; ISSEMAN; GREEN, 1990; YU; REDDY, 2007).

Há três proteínas, codificadas por genes distintos, que são identificadas como PPARs, PPAR α , PPAR δ e PPAR γ , que são expressos de modo diferente nos tecidos corporais (DREYER et al., 1992; ISSEMAN; GREEN, 1990; LAUDET et al., 1992). O PPAR- α é expresso em tecidos com alto catabolismo de ácidos graxos tais como, rim, músculo cardíaco, fígado, músculo esquelético e tecido adiposo marrom, células vasculares endoteliais e células da musculatura lisa vascular (BERGER; MOLLER, 2002; RIZZO; FIORUCCI, 2006). Este receptor favorece a β -oxidação de ácidos graxos e, inibe o catabolismo de aminoácidos e respostas inflamatórias (HARMON; LAM; GLASS, 2011). Já os PPAR δ , apesar de amplamente distribuído, porém sua expressão ocorre mais intensamente no cérebro, tecido adiposo e pele. Possui funções relacionadas ao metabolismo lipídico e de ácidos graxos, processos inflamatórios e indução de diferenciação epitelial (BOOKOUT et al., 2006; LEE, Chih-Hao et al., 2003)(BOOKOUT et al., 2006).

Os PPAR γ , por sua vez, são expressos principalmente no tecido branco e marrom, onde são essenciais para a diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos e manutenção dos adipócitos maduros, e menor quantidade em neurônios, células endoteliais, cardiomiócitos e hepatócitos (FAJAS et al., 1997; TONTONNOZ; SPIEGELMAN, 2008). Estão envolvidos na regulação da expressão de proteínas envolvidas no metabolismo de lipídios incluindo a captação, ativação e oxidação dos ácidos graxos. (ANGHEL; WAHLI, 2007; FESTUCCIA, W. T. et al., 2006; FESTUCCIA, William T. et al., 2009). Em células imunes dendríticas e os macrófagos, a ativação dos PPAR γ tem efeito contrário ao dos outros dois receptores desta família e diminui a produção de mediadores pró-inflamatórios devido a diminuição da ativação do NF κ B (MERSMANN et al., 2008).

Em relação ao sistema cardiovascular e suas condições fisiopatológicas, tem-se estudado o envolvimento e o papel terapêutico das diferentes isoformas de PPAR, evidenciando os benefícios na prevenção do desenvolvimento e progressão dessas doenças (ROBINSON; GRIEVE, 2009). Como explicado acima, a ativação de PPAR

podem levar a diferentes formas de regulação de processos relacionados ao metabolismo e à resposta inflamatória, de modo que seu efeito na fisiologia cardiovascular se estende muito além de seus efeitos estabelecidos no metabolismo de carboidratos e lipídios (BENSINGER; TONTONNOZ, 2008).

De especial interesse para o presente trabalho é o papel da ativação dos PPAR na hipertensão, o principal fator de risco para as demais doenças cardiovasculares. Mediante isso, vários modelos experimentais de HA foram usados para examinar o papel das diferentes isoformas de PPAR nesta condição. Estes incluem o modelo de sal de acetato de desoxicorticosterona (DOCA), o rato espontaneamente hipertenso (SHR) (KOBORI et al., 2005) e a infusão crônica de Ang II (ROBINSON; GRIEVE, 2009).

Diep e colaboradores, 2002 e 2004, demonstram em um estudo que a inibição da ativação de PPAR α em ratos com infusão de Ang II, é capaz de reduzir a pressão arterial e atenuar o remodelamento vascular, diminuindo a mediação inflamatória (DIEP, Q. N., BENKIRANE, K., AMIRI, F., COHN, J. S., ENDEMANN, D., & SCHIFFRIN, 2004). Já em relação, PPAR δ , seu efeito na regulação do tônus vascular e no desenvolvimento da hipertensão permanece desconhecido (ROBINSON; GRIEVE, 2009). Da mesma forma, um efeito hipotensor do tratamento com agonistas de PPAR γ foi relatado em alguns estudos com modelos experimentais de HA. No estudo de Walker e colaboradores, 1999, foi demonstrado que a ativação deste receptor reduziu a pressão arterial em ratos Zucker obesos resistentes à insulina. De igual forma, Diep e colaboradores, 2002b, verificaram que os agonistas do PPAR γ , pioglitazona e rosiglitazona causaram uma diminuição significativa da pressão arterial, na hipertensão induzida por infusão de Ang II. Além disso, nesse mesmo estudo, relataram o efeito benéfico dessa ativação no crescimento celular, na função endotelial e na inflamação vascular. Já no modelo de hipertensão DOCA sal, o tratamento com rosiglitazona normalizou a pressão arterial média, atenuou a hipertrofia concêntrica e reduziu significativamente a produção de ROS (IGLARZ et al., 2003; SATOH et al., 1999).

Em SHR, por sua vez, o efeito preciso da ativação de PPAR γ ainda é incerto, mas parece que atenua o desenvolvimento da hipertensão através de aumento da produção de óxido nítrico (NO), redução da secreção de endotelina e inibição da NADPH oxidase (ROBINSON; GRIEVE, 2009). Recentemente, foi sugerido, que os efeitos hipotensores dos agonistas do PPAR γ podem estar associados à modulação da atividade do SRAA. Sugawara e colaboradores, 2001, demonstraram que a ativação do PPAR γ diminuiu significativamente o nível de expressão AT1R em cultura de células musculares lisas de aortas torácicas de rato macho Sprague Dawley (SUGAWARA, A., TAKEUCHI, K.,

URUNO, A., IKEDA, Y., ARIMA, S., KUDO, M., 2001). Entretanto, mais recente, Todorov e colaboradores, 2007, provaram que essa ativação do PPAR γ pode estimular a transcrição de renina, o que pode resultar em um aumento da produção de Ang II com efeito sobre a pressão arterial, o que é contraditório com os efeitos hipotensores observados com os agonistas do PPAR γ (TODOROV et al., 2007).

Assim sendo, esses estudos até agora citados, propõem que o PPAR γ é capaz de modular a pressão arterial por meio de mecanismos variados. Não há consenso sobre os efeitos relacionados à ativação e, por isso, estudos mais detalhados são notoriamente necessários para investigar melhor suas ações na hipertensão.

2. Justificativa

As doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de mortalidade e morbidade da atualidade. Entre as DCVs, a hipertensão ocupa o primeiro lugar, afetando mais de milhões de pessoas. Conjuntamente, sabe-se que com o avançar da idade, especialmente em homens, há um aumento da probabilidade do aparecimento das DCV, em especial, a hipertensão. Evidências mostram que os andrógenos possuem a capacidade de modular a função cardíaca e atividade do SRA. O telmisartan pertence a família dos bloqueadores dos receptores da angiotensina, amplamente reconhecidos por causa de sua boa tolerabilidade, a possibilidade de dosagem conveniente uma vez ao dia e suas eficientes propriedades de redução da pressão arterial. Além disso, o telmisartan, também possui a capacidade de ativar o PPAR- γ de forma independente do receptor AT1 nas concentrações que são alcançadas durante o tratamento anti-hipertensivo *in vivo*. Como mencionado acima, ativação do PPAR- γ pode conferir benefícios no controle da hipertensão, resistência a insulina, inflamação e na proliferação de células musculares lisas vasculares que podem contribuir para os efeitos independentes da pressão arterial desse fármaco. Além disso, visto que há participação do SRAA na hipertensão em SHR, como já mencionado anteriormente, e que esse mesmo sistema sofre modulação pela testosterona, a proposta do estudo foi investigar os efeitos do tratamento com telmisartan por 8 semanas na contratilidade de músculos papilares de animais espontaneamente hipertensos orquiectomizados, com foco na cinética do cálcio, bem como na expressão das proteínas que participam dessa cinética.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral:

- Avaliar o efeito da orquiectomia e do tratamento por 8 semanas ao telmisartan na contratilidade de músculos papilares isolados de Ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

3.2 Objetivos específicos:

1. Investigar o efeito da orquiectomia e o tratamento do telmisartan na pressão arterial (PAS) de SHR.
2. Avaliar os efeitos da orquiectomia e da exposição ao telmisartan na contratilidade miocárdica de músculos papilares isolados, avaliando:
 - O inotropismo cardíaco;
 - Os parâmetros temporais da contração;
 - A atividade indireta do retículo sarcoplasmático de forma indireta, através do protocolo de potenciação pós-pausa;
 - A permeabilidade da membrana sarcoplasmática ao cálcio de forma indireta, através de protocolo de pos rest contraction;
 - Resposta contrátil frente a mudanças na concentração de cálcio extracelular
 - A participação da ativação β -adrenérgica nos músculos papilares do ventrículo esquerdo;
3. Mensurar, pela técnica de Western blot, a expressão de proteínas envolvidas na regulação do ciclo de cálcio no miócito cardíaco, após a orquiectomia e o tratamento com telmisartan.
4. Quantificar, pela análise histológica, a deposição de colágeno e tamanho do núcleo do miócito no miocárdio, após a orquiectomia e o tratamento com telmisartan.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Orquiectomia

Orquiectomia foi realizada através de uma incisão mediana anterior no escroto, e cada testículo foi exposto através da incisão cirúrgica. O ducto deferente foi isolado, ligado e cortado, permitindo que o testículo fosse removido. A incisão foi então fechada e suturada com catgut 3-0 cromado. Após uma semana de recuperação, o tratamento foi iniciado.

4.2 Análise da medida indireta da pressão arterial sistólica.

A pressão arterial sistólica (PAS) dos animais foi verificada no início e no final da orquiectomia e dos tratamentos, de maneira indireta, pelo método de pletismografia de cauda (IITC Life Science non-invasive blood pressure, versão 1.35). Para tal, os animais foram climatizados, três dias antes da aferição, para evitar alterações da pressão por causa do estresse do animal frente ao procedimento (Fiorim et al., 2011 e Silveira et al., 2014). No dia do registro da PAS os animais eram colocados em um cilindro de acrílico (holter). A cauda dos animais era conectada ao sensor de pressão do manguito (cuff) que por sua vez estava conectado ao amplificador e este ao computador, para obtenção da pressão arterial sistólica. Os cilindros contendo os ratos eram colocados no interior do aquecedor a 37 °C, para promover a dilatação da artéria caudal permitindo a aferição da PAS. A média de três medidas, que não variassem mais que 5 mmHg, foi utilizada.

4.3 Animais experimentais

Neste estudo foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos (SHR), orquiectomizados e não orquiectomizados, com aproximadamente três meses de idade. Esses animais foram cedidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo-UFES e foram mantidos em gaiolas, sob condições controladas de temperatura e um ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e à ração.

O uso e cuidado desses animais experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos da pesquisa com animais, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de

Experimentação Animal (COBEA-1991). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação e Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA-UFES 064/2012).

4.4 Modelo Experimental

Os animais usados nesse estudo foram divididos em 5 grupos.

- 1 - **Grupo SHAM (Sham):** ratos receberam diariamente por gavagem oral o veículo (0,5% de carboximetilcelulose de sódio; CMC-Na).
- 2 - **Grupo orquiectomizados (OQT):** ratos receberam diariamente por gavagem oral o veículo (0,5% de carboximetilcelulose de sódio; CMC-Na).
- 3 - **Grupos orquiectomizados + telmisartan (OQT + Tel):** ratos receberam diariamente por gavagem oral uma dose de 5 mg / kg / dia de telmisartan por 8 semanas.
- 4 - **Grupos orquiectomizados + telmisartan + inibidor de PPAR- γ (BADGE) (OQT + Tel+ BADGE):** ratos receberam diariamente por gavagem oral uma dose de 5 mg / kg / dia de telmisartan e pela via intraperitoneal uma dose de 30mg/ kg / dia de BADGE por 8 semanas.
- 5 - **Grupos orquiectomizados + hidralazina (OQT + Hidra):** ratos receberam diariamente por gavagem oral uma dose de 10 mg / kg / dia de hidralazina por 8 semanas.

4.5 Avaliação ponderal

No início e no final dos tratamentos, todos os grupos foram pesados com o objetivo de avaliar se a orquiectomia e/ou o tratamento com telmisartan influenciaram o ganho de peso. Além disso, após 8 semanas, os animais foram eutanaziados, os corações foram separados, pesados e corrigidos pelo comprimento da tíbia.

4.6 Metodologia empregada para avaliar a contratilidade cardíaca pela técnica de músculos papilares isolados.

4.6.1 Montagem da preparação

Após as 8 semanas de exposição ao telmisartan e de orquiectomia, os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uretana (1,2 g/ Kg) e submetidos à cirurgia de toracotomia. O coração foi retirado rapidamente e colocado em solução de Krebs-Henseleit, preliminarmente oxigenada com mistura gasosa contendo 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico, e aquecida a 29°C. A parede livre do ventrículo direito foi desmembrada expondo o septo interventricular, que foi partido ao meio para que os músculos papilares do ventrículo fossem adequadamente expostos. O músculo papilar posterior foi cuidadosamente dissecado numa placa de silicone e suas extremidades presas a anéis de aço inoxidável, sendo em seguida mergulhado em uma cuba contendo 20 ml de solução de Krebs-Henseleit. A extremidade superior foi conectada por anel e fio de aço inoxidável a um transdutor de força isométrica (TSD125 - Byopac Systems, Inc; CA) e o anel da extremidade inferior do músculo conectado a um gancho fixo na cuba de vidro como mostra a figura 3. A solução de Krebs-Henseleit (KH) é composta, em mM: 135 NaCl; 4,6 KCl; 1,25 CaCl; 1,15 MgSO₄; 1,2 KH₂PO₄; 5,5 glicose, tem pH e oxigenação mantidos pelo borbulhamento de mistura gasosa contendo 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico e temperatura controlada em 29 C por meio de um banho-maria circulante (LEITE; VASSALLO; MILL, 1988). O transdutor foi conectado a um microcomputador dotado do software AcqKnowledge® 3.7.5. (Biopac Systems Inc., CA, USA) que permitia determinar os valores das variáveis fisiológicas analisadas. Paralelamente ao músculo, posicionam-se dois eletrodos de platina acoplados a estimulador elétrico que liberam estímulos em onda quadrada de 5 milissegundos de duração. Todos os músculos foram estimulados em frequência de 0,5 Hz.

Foram feitos estiramentos consecutivos, até atingir o pico da curva estiramento-tensão definido como $L_{máx}$ (comprimento diastólico da fibra muscular associado à máxima força isométrica desenvolvida). Após atingir o $L_{máx}$, o músculo permaneceu por um período de estabilização de 60 minutos, a partir do qual iniciaram-se os protocolos experimentais.

Ao final do experimento, os papilares foram pesados e a força de contração isométrica desenvolvida foi corrigida pelo peso dos músculos.

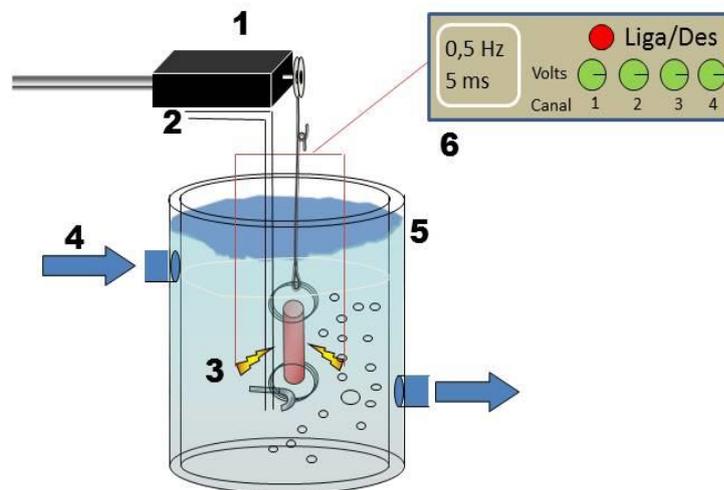


Figura 3. Esquema representativo do sistema de avaliação da contratilidade de músculo papilares. 1: transdutor de força, 2: sistema de aerção com mistura carbogênica, 3: eletrodos, 4: banho, 5: cuba, 6: eletroestimulador.

4.6.2 Protocolos experimentais

Força de contração isométrica e parâmetros temporais de força

Após o período de estabilização foram mensuradas: a força desenvolvida (F) os tempos de ativação e relaxamento e as derivadas temporais de força (dF/dt) positiva e negativa das contrações isométricas dos músculos papilares (Figura 4). Estes parâmetros foram avaliados em todos os grupos experimentais. Os resultados de força isométrica foram expressos em gramas por miligramas de peso do músculo. Os tempos de ativação e relaxamento são os tempos gastos, respectivamente, para atingir o pico da força desenvolvida e para a força decrescer 50% de seu valor máximo desenvolvido (VASSALLO et al., 2008).

4.6.3 Avaliação indireta da atividade do retículo sarcoplasmático

O protocolo da avaliação das potenciações relativas pós-pausa (PPP) foi realizado para avaliar a amplitude da contração após a pausa, classificado como indicador da

função do RS (figura 4). Estas potenciações foram obtidas por meio da re-estimulação elétrica após pausas de 15, 30 e 60 (segundos) no estímulo elétrico aplicado no músculo (VASSALLO; MILL, 1988).

A potenciação relativa foi considerada como a razão entre a amplitude da contração após a pausa e a amplitude da contração antes da pausa, aguardando-se o regresso da contração para as condições basais entre um teste de pausa de estímulos e outro (RS) (LEITE; VASSALLO; MILL, 1991; MILL; VASSALLO; LEITE, 1992; VASSALLO; MILL, 1988).

4.6.4 Avaliação da resposta contrátil frente a mudanças na concentração de cálcio extracelular.

Para avaliar a resposta inotrópica ao cálcio, foi realizada uma curva concentração-resposta ao cálcio (Figura 4). Para isso, a solução nutritora foi trocada por uma solução contendo a metade da concentração de Ca^{2+} (0,62 mM). Após um período de estabilização de aproximadamente 20 minutos, foram crescidas doses de uma solução com elevada concentração de cloreto de cálcio (500 mM), para avaliação da resposta inotrópica do músculo ao Ca^{2+} . Esta curva foi avaliada pela amplitude máxima da contração estabilizada, após o acréscimo na concentração extracelular de cloreto de cálcio (0,62, 1,25, 2,5 e 3,75 mM) na perfusão dos músculos papilares isolados dos ratos de todos os grupos experimentais. A variação de força foi corrigida pelo peso dos músculos e expressa em g/mg.

4.6.5 Medida indireta do influxo de cálcio transsarcolemal “*post rest contraction-prc*”

As contrações obtidas após pausa de 10 minutos no estímulo elétrico (PRC) foram realizadas para avaliar a intervenção da orquiectomia e da exposição ao telmisartan no influxo de cálcio transsarcolemal para contração miocárdica (figura 4). Para isso, foi utilizada a solução “Krebs” previamente descrita, porém livre de cálcio (cálcio Free) e acrescida de 10 mM de cafeína. Este procedimento permite anular o conteúdo de cálcio intracelular e do RS, uma vez que a cafeína nessas concentrações depleta os estoques intracelulares de cálcio por se ligar aos receptores de rianodina do RS (BASSANI; BASSANI; BERS, 1994; LEITE; VASSALLO; MILL, 1995). ao mesmo tempo que, a

ausência de cálcio na facilita a extrusão de cálcio pelo sarcolema (VASSALLO et al., 2008). Os músculos foram lavados, por duas vezes, com a solução Ca^{2+} free até as contrações serem abolidas (RINGER, 1883) e, em seguida, o estímulo elétrico foi cessado por 10 minutos. Segundos antes de a estimulação ser reiniciada, as preparações eram re-perfundidas com solução Krebs-Henseleit normal (1,25 mM de cálcio). Desta forma, pode-se inferir que a primeira contração após a pausa de 10 minutos é dependente do cálcio proveniente do meio extracelular, visto que os estoques intracelulares foram depletados. Esta contração após o repouso de estímulos foi expressa como a porcentagem em relação à amplitude da contração em $L_{\text{máx}}$ (antes do repouso de estímulos).

4.6.6 Avaliação da resposta contrátil frente à estimulação beta-adrenérgica

Para avaliar se a orquiectomia e o tratamento com telmisartan foram capazes de alterar responsividade beta-adrenérgica foi realizada uma curva concentração-resposta ao isoproterenol (10^{-11} μM a 10^{-5} μM), um agonista beta-adrenérgico (figura 4). Para isso, os músculos papilares dos animais experimentais foram perfundidos com solução de Krebs contendo concentração de cálcio 0,62 mM. Após estabilização funcional da preparação, foram adicionadas ao banho, concentrações crescentes de isoproterenol (10^{-11} μM a 10^{-5} μM) (VASSALLO et al., 1994). A variação de força foi corrigida pelo peso dos músculos e expressa em g/mg.

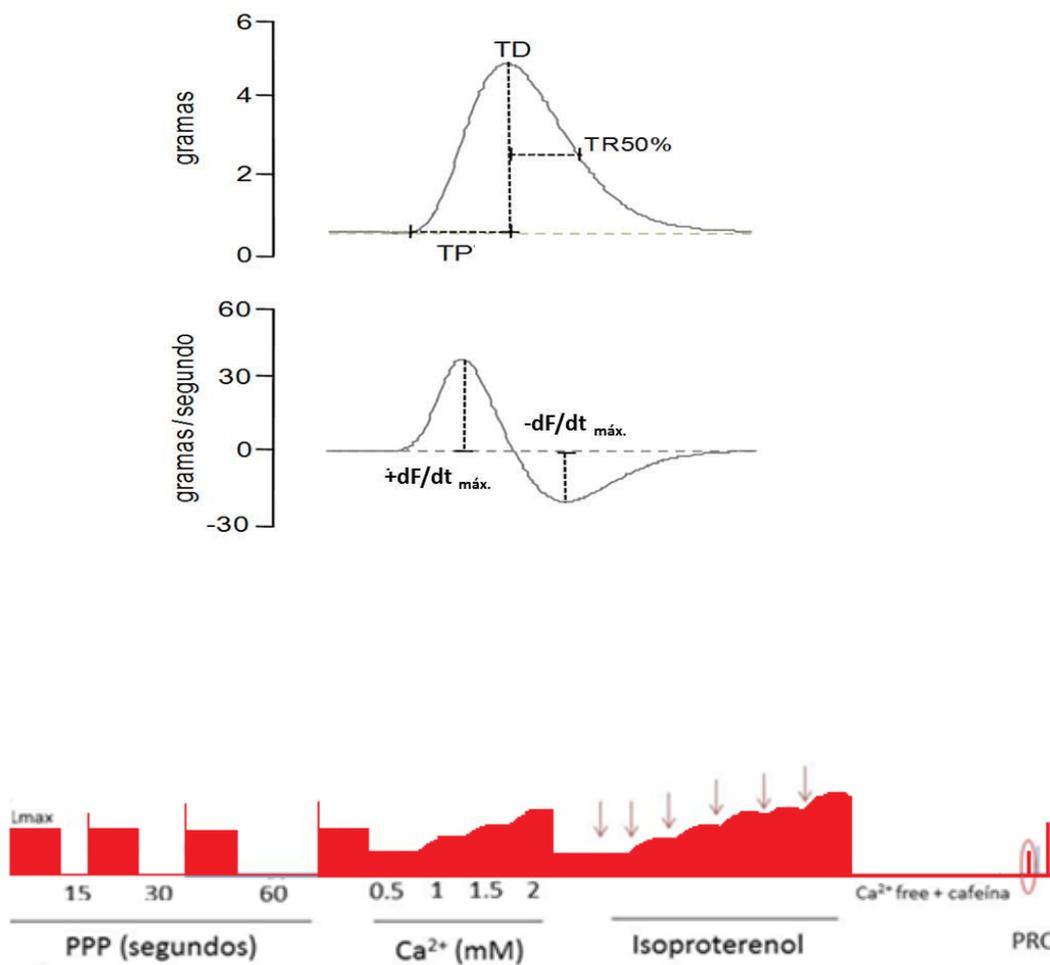


Figura 4. Esquema representativo do protocolo de avaliação de contratilidade de músculos papilares. TP: Tempo para o Pico de força, TR₅₀: Tempo para 50% do relaxamento, PPP: Potenciação Pós Pausa, PRC: Post Resting Contraction.

4.7 Western blot

As amostras de corações congeladas foram trituradas com tampão RIPA gelado (Sigma Aldrich) usando um misturador. O lisado foi centrifugado a 6000 RPM, o sobrenadante foi coletado e a concentração de proteína foi determinada pelo ensaio de Bradford (Bio-rad). Alíquotas contendo 40 µg de proteína foram preparadas para cada animal e carregadas em 7,5, 10 ou 12% de géis de acrilamida TGX Stain-Free (Bio-rad). A coleta de proteínas das amostras foi separada por eletroforese em sistema Mini-PROTEAN Tetracell (Bio-rad) por 2h em 120V em tampão running contendo 140mM de glicina, 37mM de Tris-Base e 1% de Dodecil Sulfato de Sódio (Sigma Aldrich). Os géis foram então ativados com irradiação UV (ChemiDocXRS + Sistema de Imagem, Bio-rad) por 1 minuto, produzindo sinal fluorescente por resíduos de triptofano presentes nas proteínas. O teor de proteína foi transferido por via úmida para uma membrana de nitrocelulose (Bio-rad) durante 18 h a 0,25 A numa solução de transferência arrefecida com gelo contendo glicina 140 mM, base Tris 37 mM e 20% de metanol. O conteúdo total de proteína para cada amostra foi adquirido por imagem da emissão de fluorescência (ChemiDoc XRS +, Bio-rad). As membranas foram bloqueadas com leite desnatado a 5% (Molico, Nestlé) em solução Tris-tamponada com Tween 20 (TBST) por 1h sob agitação e temperatura ambiente e incubadas com os anticorpos primários: anti-NCX 1: 1000 (Thermo Fisher), anti-SERCA2 ATPase 1: 1000 (Thermo Fisher), anti-AT1 1: 250 (Santa Cruz), anti-Fosfolamban 1: 1000 (Thermo Fisher) ou anti-Fosfolamban ser16 fosforilado, anti-PPAR γ 1: 1000 (Santa Cruz) TBST por agitação durante a noite a 4 °C. Depois de completamente lavadas, as membranas foram incubadas com Strep Tactin HRP-conjugado 1: 5000 e anticorpo secundário adequado: anti-mouse 1: 5000 (Sigma Aldrich) ou anti-rabbit 1: 5000 (Sigma Aldrich) todos em soro bovino a 3% albumina (Sigma) em TBST por 1h em agitação quando foi lavada com TBTS. Um substrato quimioluminescente (0,2 mM de ácido cumarico, 1,25 mM de luminol, 0,1 M de Tris-HCl e 0,06% de peróxido de hidrogênio) para as membranas e fotos foi coletado com ChemiDoc XRS + e a intensidade de luminescência foi quantificada e normalizada pela proteína total contida da amostra usando o software Image Lab 6.0.1 (Bio-rad).

4.8 Análise histológica

Após pesagem, O VE foi seccionado ao meio e a metade apical de cada ventrículo foi fixada em solução tampão fosfato com formol 4% (0,01mM; pH7,4). Após o período de fixação, o VE foi disposto em cassete plástico do tipo processador/incluser. Os cassetes foram processados em aparelho automatizado com ciclo total de 12 horas para desidratação em soluções com concentrações crescentes de álcool etílico até chegar ao absoluto (100%) e diafanização em xilol. O material foi incluído em parafina e cortados em micrótomo da Leica na espessura de 5 μ M. As seções foram colocadas em uma lâmina de vidro e expostas a uma temperatura de 37°C para secagem. O material foi desparafinado em xilol e hidratado em álcool para coloração de Hematoxilina e Eosina, para análise de hipertrofia cardíaca e picrossirius red, para análise da deposição de colágeno.

Após a coloração, as lâminas foram visualizadas em microscópio de luz (LEICA DM/LS) ligado à uma câmera. Foram feitas 3 fotos por lâmina e as imagens foram analisadas pelo software image J.

Para avaliação da hipertrofia cardíaca, o tamanho do núcleo, corado pelo método hematoxilina - eosina, foi estimado em imagens obtidas no aumento de 400x e foram considerados apenas os núcleos totalmente visíveis e que apresentavam formato elipsóide, em seleção manual. Os núcleos cortados na horizontal ou em sentido transversal foram desprezados.

Para avaliar a deposição de colágeno no miocárdio, as análises foram feitas utilizando limite mínimo de vermelho em 87 e máximo ajustado manualmente, numa média aproximada de 160.

O programa Image J, com base nestes valores, apresentou a porcentagem da área marcada, correspondente à coloração de colágeno por picrossirius red. Foram analisados três campos visuais de cada amostra e calculada a média destes valores, para o valor individual da amostra e cada grupo foi composto de pelo menos 4 amostras.

4.9 Análise estatística

Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. (EPM). Os valores de “n” representam o número de animais ou amostras utilizadas em cada protocolo experimental.

A análise estatística dos resultados foi realizada por análise de variância (ANOVA), uma ou duas vias. Quando a análise de variância apresentava significância, esta era seguida pelo teste post-hoc de Fischer. Foram considerados estatisticamente significantes valores de $P < 0,05$. Para as análises estatísticas e plotagem de todos os gráficos foi empregado o GraphPad Prisma 4.0 (San Diego, CA, USA).

4.10 Fármacos e reagentes

2-Hidroxietilmercaptano (-mercaptoetanol) (Sigma)
Acetato de Chumbo II (Sigma)
Ácido clorídrico – HCl (Merck)
Ácido tricloroacético (Merck)
Albumina, Soro Bovina (Sigma)
Álcool polivinílico (Merck)
Anticorpo produzido em camundongo para fosfolambam (Thermo Scientific)
Anticorpo produzido em camundongo para NCX (Thermo Scientific)
Anticorpo produzido em camundongo para SERCA-2 (Thermo Scientific)
Anticorpo produzido em camundongo para receptores AT1 (Santa Cruz)
Anticorpo produzido em camundongo para receptores Fosfolamban ser16 fosforilado (Thermo Scientific)
Anticorpo produzido em camundongo para PPAR- γ (santa Cruz)
Anticorpo produzido em rato para GAPDH (Abcam)
Bicarbonato de sódio - NaHCO₃ (Merck)
Bisphenol A diglycidyl ether (Sigma)
Cafeína (B.HERZOG)
Carboximetilcelulose de sódio (Sigma)
Cloreto de cálcio dihidratado - CaCl₂. 2H₂O (Merck)
Cloreto de magnésio Hexahidratado - MgCl₂. 6H₂O (Merck)
Cloreto de potássio - KCl (Merck)
Cloreto de sódio - NaCl (Vetec)
Dodecil sulfato sódico (SDS) (Sigma)
Etanol absoluto (Sigma)
EDTA (Sigma)
EGTA (sigma)
Eosina (Merck)
Fosfato de sódio monobásico - NaH₂PO₄ (Merck)
Glicerol (Reagen)
Glicose (Vetec)
Hematoxilina (Sigma)
Heparina sódica (Roche)
HEPES (Sigma)

Hidralazina (Sigma)
Hidrato de cloral (Reagen)
Hidróxido de Sódio (Merck)
KH₂PO₄ (Merck)
L-Isoproterenol (Sigma)
Molibdato de amônio (Nuclear)
Metanol (Sigma)
N, N, N', N'-tetrametil-etilenodiamina (Temed) (Sigma)
N, N'- Metilenbisacrilamida 40% Solução 37, 5:1 (Acrilamida) (Sigma)
NaVO₃
Ouabaína, octahidrato (Sigma)
Reagente para detecção de Western Blot (ECL Plus) (Amersham)
Sulfato de sódio - Na₂SO₄ (Merck)
Solução de formaldeído (Sigma)
Persulfato de amônio (APS) (Sigma)
Picrossirius red (Sigma)
Polioxietileno sorbitam monolaurato (Tween 20) (Sigma)
Xilol (Sigma)
Telmisartan (Micardis)
Tris-HCl (Sigma)
Triton X-100 (VETEC)
Uretana sódica (Sigma)

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação ponderal

Os grupos Sham e OQT iniciaram e terminaram o tratamento com pesos semelhantes, sugerindo que 8 semanas de orquiectomia não foram capazes de modificar o peso corporal. No entanto, quando os mesmos animais foram tratados com telmisartan, o peso foi reduzido. A adição de BADGE no tratamento não modificou o peso corporal dos animais, permanecendo semelhante ao grupo OQT Tel (Tabela 1). As mesmas alterações foram observadas quando analisamos o peso normal do coração e o peso do papilar (Figura 5A), sugerindo que a orquiectomia não aumenta o grau de hipertrofia observado em animais SHR. O tratamento com telmisartan reduziu a hipertrofia em animais hipertensos. O inibidor PPAR GAMA prejudicou o efeito anti-hipertrófico do telmisartan, sugerindo que a ativação do PPAR GAMA contribui para a melhora encontrada no OQT Tel., no entanto, o peso dos músculos papilares não foi alterado pelo tratamento com BADGE.

5.2 Avaliação da pressão arterial sistólica pela técnica de pletismografia de caúda

A PAS foi avaliada no início e no final dos tratamentos pela técnica de pletismografia da cauda. Conforme demonstrado na tabela 1, a orquiectomia não foi eficaz em modificar a pressão arterial sistólica no final das 8 semanas. No entanto, como esperado, a PAS dos grupos tratados com telmisartan foi reduzida. (Sham: $186,6 \pm 3,86$; OQT: $184,8 \pm 8,7$; OQT + Tel: $109,9 \pm 1,61$ *; OQT + Tel + BADGE: $106,4 \pm 1,30$ *; * $P < 0,05$ ANOVA duas Vias seguidas, post-hoc de Fischer).

Tabela 1: Efeito do tratamento com telmisartan sobre o peso corporal, o peso do coração, o comprimento da tibia, razão comprimento da tibia / peso do coração e a pressão arterial.

	Massa corporal (g)	Coração/ tibia (g/mm)	Pressão arterial (mmHg)	n (grupo)
SHAM	315.87± 4.9	35.35 ±1.9	186,67 ± 3,9	9
OQT	296.10± 6.2	31.77 ± 1.6	184,84 ± 8,8	11
OQT+ HIDRA	318± 13.63	45.73 ± 3.2*	111,97 ± 1,9*#	7
OQT+TEL	282.90± 6.5*	27.24 ± 2.4*#	109,34 ± 1,6*#	13
OQT+TEL+BADGE	278±10.6*\$	37.86 ± 1.8@	106,48 ± 1,3*#	9

Os dados estão expressos como média ± EPM. *vs SHAM; # vs OQT; \$vs OQT+ HIDRA; @ vs OQT+ TEL: P<0,05. Realizado por ANOVA duas vias seguida por teste post-hoc de Fisher.

5.3 Avaliação da contratilidade miocárdica em músculos papilares isolados

Embora a orquiectomia ao final das 8 semanas não tenha alterado a PAS, já foi possível detectar redução na força de contração dos músculos papilares isolados (figura 5B). Contudo quando este grupo foi tratado com telmisartan, a diminuição da contração foi impedida. Da mesma forma, o grupo orquiectomizado tratado com telmisartan e BADGE, o prejuízo na força de contração também não foi observado (Figura 5B).

Como forma de descartar o efeito da redução da pressão arterial em nossos achados, um grupo foi tratado com hidralazina por 8 semanas. Como mostra figura 6B, o tratamento com hidralazina não impediu a redução da força de contração dos músculos papilares ao final do tratamento. Assim sendo, os dados relativos ao tratamento com hidralazina não são apresentados nos demais protocolos. Além disso, a derivada positiva da força ($dF / dt +$) foi reduzido no grupo orquiectomizado (Figura 5E), em comparação com o sham, enquanto a derivada negativa ($dF / dt-$) permaneceu inalterado (Figura 5F). É possível notar também que a redução observada na derivada positiva, foi prevenida com o tratamento com telmisartan e foi melhorado ainda mais pelo co-tratamento com telmisartan e BADGE. Ao avaliar os parâmetros temporais da contratilidade, o tempo de relaxamento permaneceu inalterado e o tempo de ativação apresentou uma redução apenas no grupo OQT + tel + BADGE quando comparado ao grupo sham e ao grupo OQT.

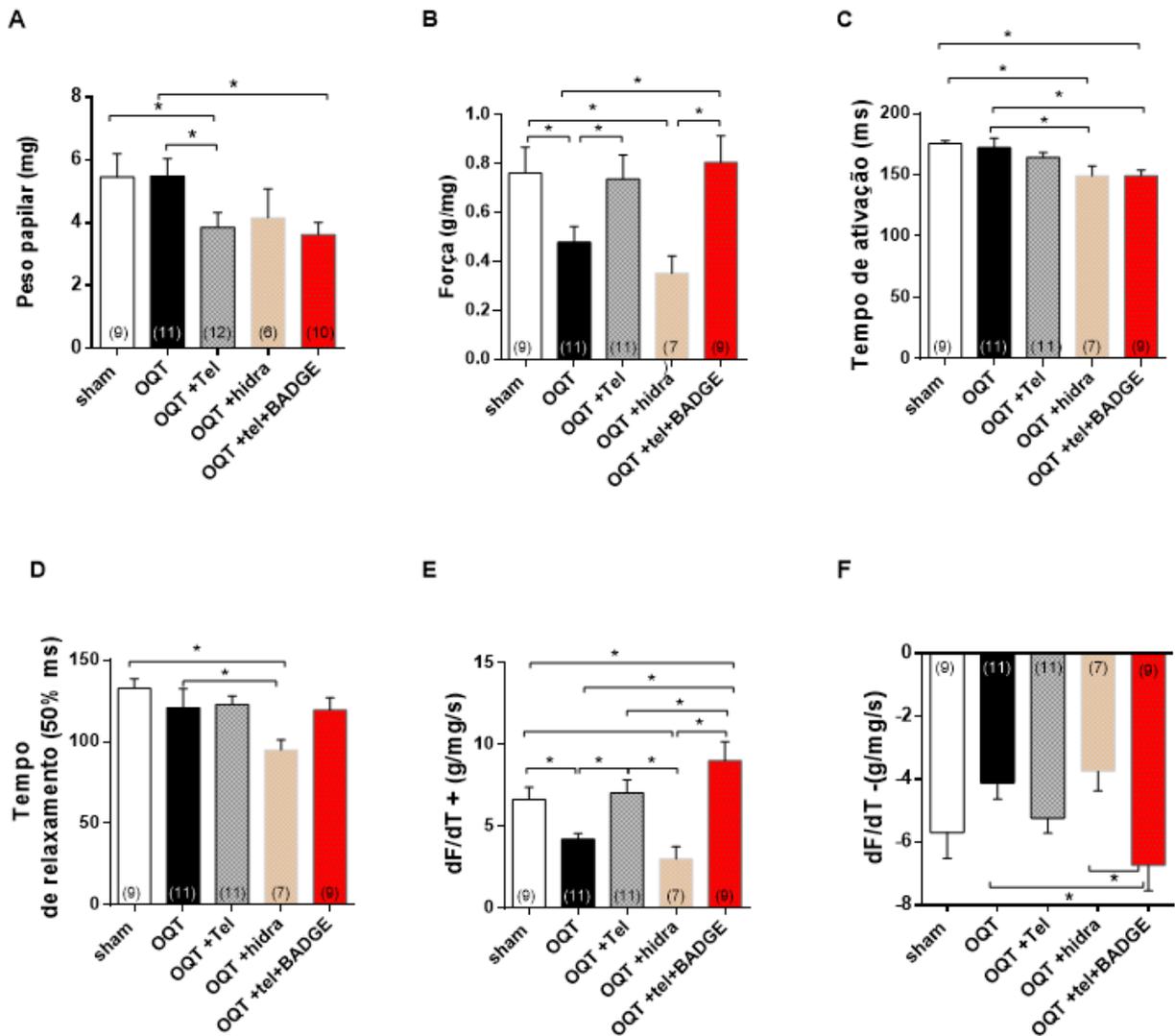


Figura 5: Peso do papilar, força isométrica desenvolvida, primeiras derivadas do desenvolvimento de força e parâmetros temporais de contração dos músculos papilares do ventrículo esquerdo de ratos de todos os grupos experimentais. (A) Peso papilar (B) força isométrica, (C) tempo de ativação e (D) tempo para 50% de relaxamento, (E) derivada máxima positiva e (F) derivada máxima negativa da força (+ dF / dtmax e -dF / dtmax respectivamente). Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Os dados são expressos como média \pm SEM. * P < 0,05, one-way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Fischer para comparações múltiplas.

Como forma de avaliar quais mecanismos estariam envolvidos na redução da contração induzida pela OQT, o primeiro protocolo experimental realizado foi a avaliação indireta da atividade do retículo sarcoplasmático (RS), conforme descrito na metodologia. Nota-se que nem os ratos submetidos a orquiectomia nem os ratos tratados com telmisartan alteraram o funcionamento do RS, uma vez que a potenciação após a pausa

foi semelhante ao grupo controle (sham). Em contrapartida, o grupo tratado com telmisartan e BADGE apresentou prejuízo na potencialização após a pausa (Fig 6).

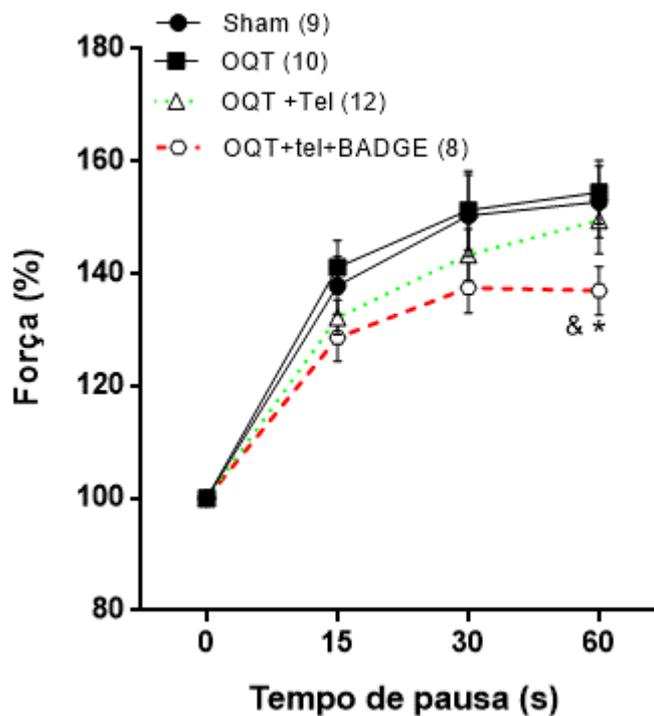


Figura 6: Avaliação, in vitro, das potenciações relativas após as pausas de 15, 30 e 60 segundos dos músculos papilares do VE de ratos Sham, orquiectomizados (OQT), orquiectomizados tratados com telmisartan (OQT + Tel), orquiectomizados tratados com telmisartan e BADGE (OQT + Tel + BADGE). Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Os dados são expressos como média \pm SEM. * $P < 0,05$ vs Sham; & $P < 0,05$ vs OQT; ANOVA two-way seguido pelo teste post-hoc de Fischer para comparações múltiplas

Outra análise importante do nosso estudo foi investigar se a orquiectomia e o tratamento com telmisartan poderia modificar a resposta inotrópica dos músculos papilares isolados. Para isso, foram realizadas curvas concentração-resposta ao cálcio e ao isoproterenol.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 7A, observou-se que a resposta inotrópica ao cálcio foi menor em músculos papilares do grupo OQT em relação ao grupo sham. Entretanto, o tratamento com telmisartan preveniu o dano na resposta inotrópica ao cálcio observada no grupo OQT. Da mesma forma, os ratos OQT tratados com telmisartan e BADGE apresentam maior resposta inotrópica ao cálcio. Nota-se,

ainda, que nesse mesmo grupo tratado com telmisartan e BADGE a resposta nas doses iniciais da curva de cálcio foi maior que no grupo OQT+Tel. Este mesmo comportamento foi observado quando foi avaliada a resposta à estimulação adrenérgica pelo isoproterenol (Figura 7B). O grupo OQT apresentou um prejuízo na resposta a estimulação adrenérgica e de modo igual, tanto o grupo OQT+Tel e o grupo OQT+Tel+BADGE preveniram a queda na resposta adrenérgica (figura 7B). Identicamente, essa resposta foi ainda maior no grupo Tel+ BADGE quando comparado com o grupo tratado somente com telmisartan.

Com intuito de avaliar se a menor resposta inotrópica ao aumento de cálcio extracelular observado em músculos papilares isolados de ratos OQT poderia estar relacionada às alterações no influxo de cálcio pelos canais do tipo L, foi realizado a PRC, segundo descrito na metodologia (LEITE; VASSALLO; MILL, 1995). De acordo com nossos resultados, a PRC foi similar em papilares isolados OQT e sham. No entanto, no grupo OQT tratado com telmisartan teve um aumento de 39% e grupo OCT + tel + BADGE de 110%, em relação ao grupo OQT (Figura 7C). Este resultado sugere que o tratamento com telmisartan foi capaz de aumentar o fluxo de cálcio trans-sarcolemal mesmo sem orquiectomia ter causando uma mudança. Além disso, percebe-se novamente, que quando o efeito do telmisartan é somente no bloqueio dos receptores AT1 a melhora é ainda maior.

Além de promover alterações funcionais, a orquiectomia e os tratamentos podem culminar em alterações celulares estruturais. Sendo assim com a finalidade de investigar estes possíveis comprometimentos foi utilizada a técnica de Western blot para quantificação de importantes proteínas envolvidas na regulação da contratilidade miocárdica. A avaliação das proteínas reguladoras da contratilidade muscular incluiu as medidas de: SERCA2, NCX, PLB total, PLB ser16. Além disso, foi feita a quantificação também da expressão dos receptores AT1, principal receptor do sistema renina angiotensina e ainda o PPAR gamma. Como mostrado na figura 6, as alterações funcionais observadas na orquiectomia e o tratamento com telmisartan foram acompanhados por alteração na expressão dessas proteínas. O grupo OQT teve a expressão de SERCA aumentada, mas a expressão da PBL total, PBL ser¹⁶ e do NCX permaneceram inalterada. Neste mesmo grupo a orquiectomia não foi capaz de alterar a expressão do receptor AT1. No grupo OQT tratado com telmisartan observou-se redução na expressão de NCX e na expressão de PBL total sem, contudo, alterar a expressão de SERCA e da PBL ser¹⁶. A expressão de AT1 neste grupo já foi aumentada. A expressão de PBL total também foi reduzida no grupo telmisartan mais BADGE, sem que a

expressão da PBL ser16, da SERCA e AT1 fosse alterada, já a expressão do NCX foi aumentada. Em todos os grupos estudados a expressão do PPAR gama não foi alterado (Figura 7I).

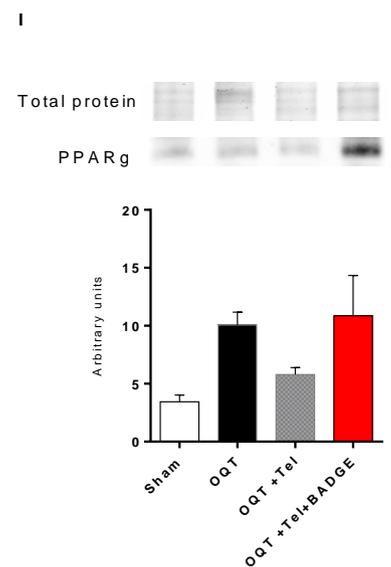
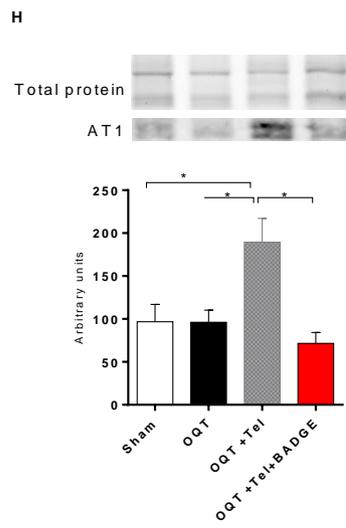
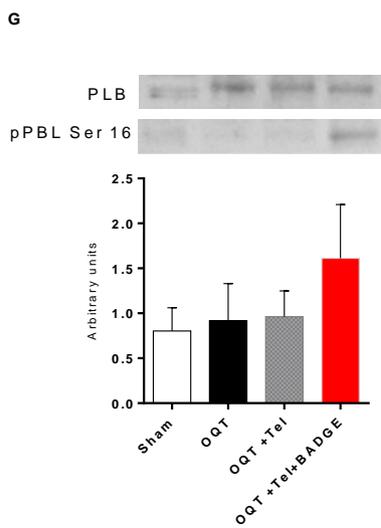
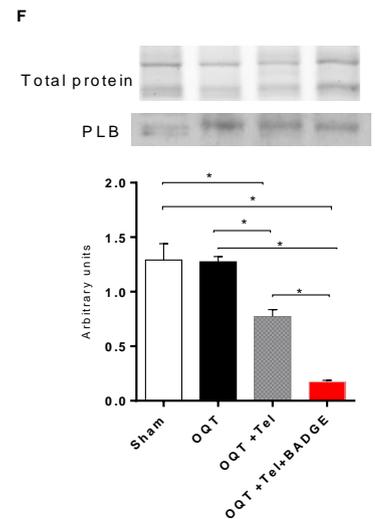
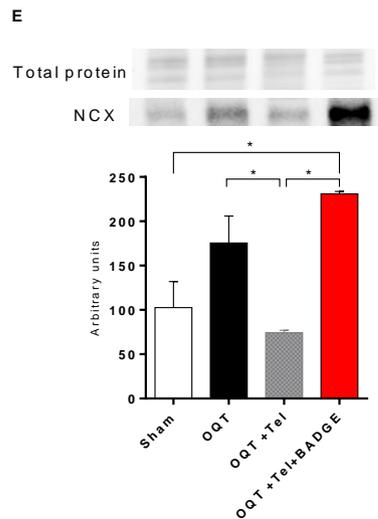
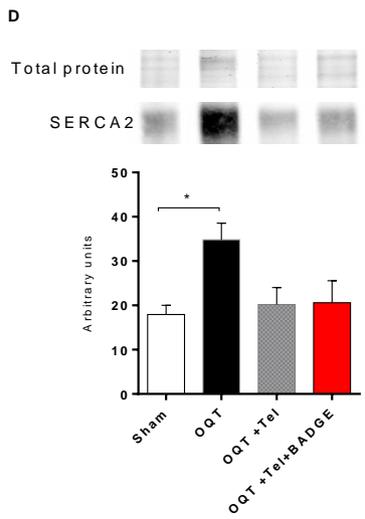
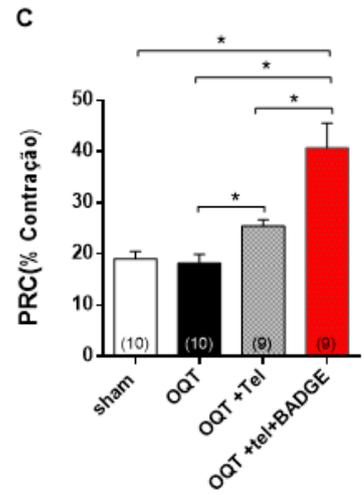
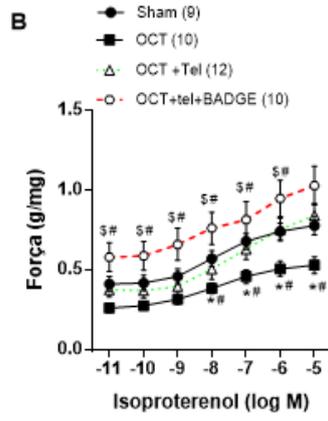
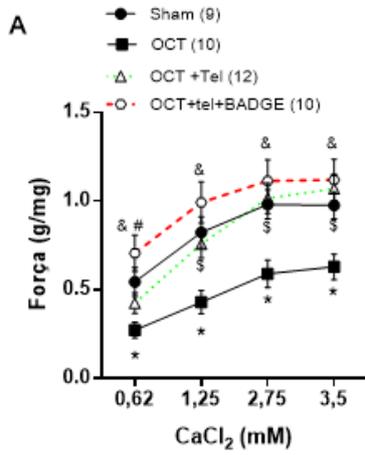


Figura 7: Resposta contrátil á diferentes protocolos experimentais e análise densitométrica de Western blots de ratos Sham, orquiectomizados (OQT), orquiectomizados tratados com telmisartan (OQT + Tel), orquiectomizados tratados com telmisartan e BADGE (OQT + Tel + BADGE). (A) Força desenvolvida durante incrementos da concentração de Ca^{2+} , (B) respostas inotrópicas do músculo cardíaco ao isoproterenol, (C) Contração dependente do influxo de cálcio trans -arcolemal, (D) SERCA2 (6), (E) NCX (6), (F) PBL (6), (G) pPBLSer16 (6), (H) AT1(6), (I) PPARg (6). Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Os dados são expressos como média \pm SEM. * P <0,05 vs Sham; \$ P <0,05 vs OQT, # P <0,05 vs OQT + Tel, & P <0,05 vs OQT vs OQT BADGE.

5.4 Análise histológica

Embora a massa muscular cardíaca e músculo e papilar não tenham se alterado, os animais orquiectomizados apresentaram redução no perímetro e na área nuclear, e esse efeito foi impedido pela inibição do PPAR GAMA, como mostra a figura 8. Essa redução é ainda mais pronunciada no grupo OQT + Tel, indicando um papel conjunto de SRA e testosterona neste processo.

A redução dos indicadores de tamanho nuclear também não foi acompanhada por alteração do conteúdo de colágeno. Embora o perímetro e área nuclear do grupo OQT estejam reduzidos, de maneira ainda mais intensa nos animais que receberam o co-tratamento com telmisartan, a deposição de colágeno mensurada como porcentagem da área da imagem, é similar à do grupo SHAM.

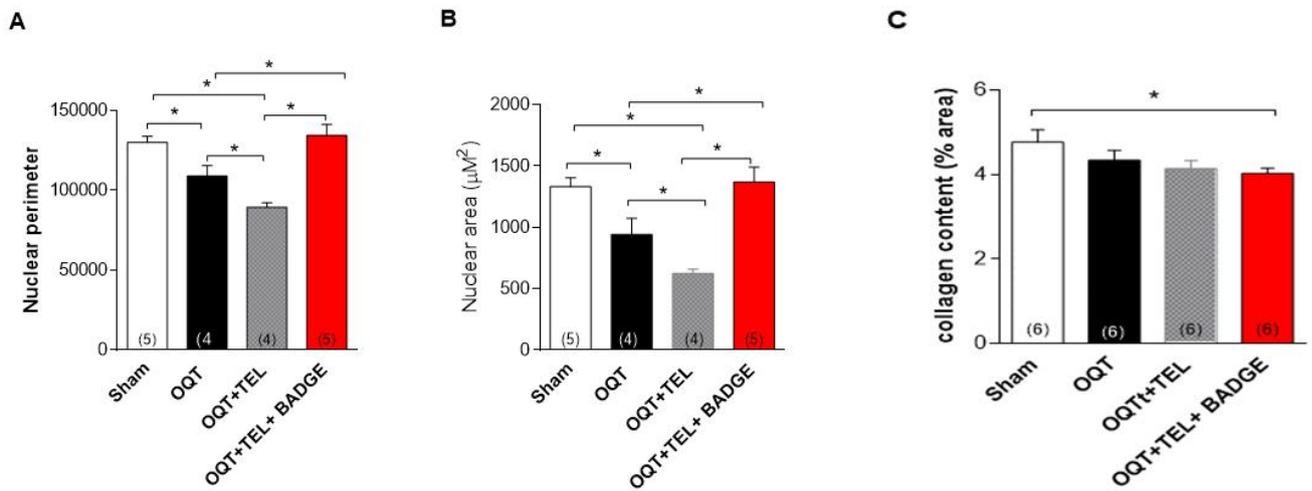
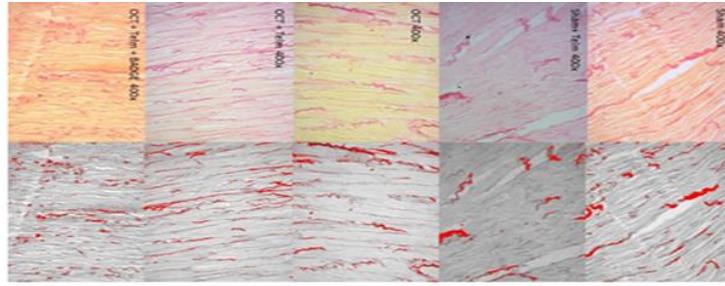


Figura 8: Indicadores de tamanho nuclear e deposição de colágeno no coração. (A) Perímetro nuclear, (B) Área nuclear, (C) Teor de colágeno de ratos Sham, orquiectomizados (OQT), orquiectomizados tratados com telmisartan (OQT + Tel), orquiectomizados tratados com telmisartan e BADGE (OQT + Tel + BADGE). Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Os dados são expressos como média \pm SEM. * $P < 0,05$, one-way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Fischer para comparações múltiplas.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstramos que a orquiectomia reduziu a força de contração dos músculos papilares de SHRs, possivelmente por prejudicar a resposta inotrópica ao cálcio e a responsividade à estimulação adrenérgica, sem alterar a pressão arterial. Encontramos ainda que, o tratamento com telmisartan previne o comprometimento da resposta ao cálcio e da resposta beta adrenérgicos observado nos ratos orquiectomizados, impedindo a queda da força de contração observada.

Esse aumento na contratilidade no grupo OQT+Tel foi acompanhado, também, de uma redução de indicadores da hipertrofia cardíaca. Além disso, sugere-se que a ativação do PPAR- γ pelo telmisartan atenua o influxo de cálcio transsarcolemal impedindo uma possível sobrecarga de cálcio decorrente de um efeito exclusivo do telmisartan no antagonismo dos receptores AT1.

De fato, já é demonstrado que a testosterona desempenha um importante papel no acoplamento excitação-contração cardíaca pela modulação dos mecanismos envolvidos na homeostase intracelular do Cálcio (AYAZ; HOWLETT, 2015).

Os efeitos biológicos dos andrógenos são mediados por interações com receptores androgênicos e já se sabe que esses receptores estão presentes em tecidos como fígado, rim, cérebro, músculo esquelético e coração, garantindo assim, aos andrógenos a capacidade de regular processos fisiológicos, como a função miocárdica (AHTIAINEN et al., 2011; CREDIT et al., 2002b; DART et al., 2013; MARSH et al., 1998).

De igual modo, estudos demonstram também, que a falta de testosterona diminui a contratilidade de ventrículos esquerdos, atividade da ATPase Miosínica e aumenta o estresse oxidativo em corações isolados de ratos machos ((AYAZ; HOWLETT, 2015; BEST et al., 2005; GOLDEN et al., 2004b; TAM et al., 2003; VUTTHASATHIEN; WATTANAPERMPPOOL, 2015).

A falta de testosterona pode provocar ainda, redução do pico máximo de contração, retardo no relaxamento em corações isolados perfundidos, redução da resposta máxima do miofilamentos ao cálcio (WITAYAVANITKUL et al., 2013) e diminuição do conteúdo de cálcio do RS (TSANG et al., 2009) que culmina então com a redução força de contração.

De modo semelhante ao descrito pelos estudos citados, nos nossos resultados, os animais OQT apresentaram uma redução no pico máximo de contração e na derivada positiva (+dP/dT), porém, os tempos de relaxamento, de ativação e a derivada negativa não foram alterados, demonstrando, assim, que diferentemente dos outros estudos que

foram realizados em corações isolados, no nosso estudo o relaxamento não foi prejudicado (Figura 5C, 5D e 5F). Este resultado sugere que há preservação da função dos mecanismos de extrusão do cálcio, mesmo na condição da orquiectomia. Realmente, quando avaliamos de forma indireta a recaptação do cálcio pelo RS no grupo orquiectomizados parece não ter sido alterado, uma vez que a PPP foi semelhante ao grupo sham.

Quando investigamos a expressão de proteínas importante envolvidas na cinética do cálcio, percebe-se que a SERCA teve a sua expressão aumentada no grupo OQT comparada com os demais grupos, sem alterar a expressão do NCX e PBL, indicando que o conteúdo de cálcio no RS pode não ter sido reduzido e que a importação de cálcio não é prejudicada, o que se reflete na manutenção dos índices de relaxamento entre os grupos SHAM e OQT. De fato, alguns trabalhos têm demonstrados que a deficiência de testosterona não altera a expressão da SERCA e nem as demais proteínas acima citadas no coração (DALPIAZ et al., 2015; RIBEIRO JÚNIOR et al., 2018; WITAYAVANITKUL et al., 2013). Acreditamos que a expressão da SERCA foi aumentada no nosso trabalho como um mecanismo compensatório a perda de contratilidade imposta pela orquiectomia. Presume-se que a diferença encontrada entre o nosso estudo e os demais estudos apresentados acima seja, em partes, devido ao modelo de estudo e o tempo de orquiectomia.

Outrossim, quando realizamos protocolos que examinaram a resposta dos músculos papilares ao conteúdo de cálcio extracelular, a resposta à estimulação do receptor beta e o influxo de cálcio transarcolemal observa-se que esse mesmo grupo OQT apresentou um prejuízo em todas essas respostas (Fig. 7A, 7B e 7C).

Esse conjunto de dados sugere que a orquiectomia pode estar alterando a sensibilidade das proteínas contráteis, sem, no entanto, alterar o influxo transarcolemal de cálcio avaliado indiretamente pelo protocolo PRC descrito na metodologia. Por certo a deficiência da testosterona pode alterar a interação das proteínas contráteis com o cálcio, reduzir a atividade da ATPase miosínica e sensibilidade das proteínas contráteis, e estes efeitos podem levar uma a força de contração reduzida (WITAYAVANITKUL et al., 2013).

Como já mencionado, os efeitos da testosterona na função cardíaca podem ser também mediados pela interação com o sistema renina angiotensina modulando a função cardíaca e a pressão arterial. Como já demonstrado na literatura, na presença da testosterona há uma maior produção de angiotensinogênio no fígado e um aumento da atividade da renina, enzima responsável por produzir a Angio I. Por consequência, pode

haver maior produção da Angio II, principal hormônio efetor do sistema SRA (JAMES, G D et al., 1986; CHEN; NAFTILAN; OPARIL, 1992), responsável por todos os efeitos periféricos associados ao sistema clássico (BARRETOS-CHAVES MLM, 2012). Além do mais, há evidência de que na presença da testosterona há um aumento da relação AT1R/AT2R com um aumento na expressão dos receptores AT1 e uma redução na expressão dos AT2R (MISHRA; HANKINS; KUMAR, 2016; SULLIVAN et al., 2010).

No nosso estudo utilizamos ratos SHR OQT, um modelo que combina deficiência na produção de hormônios sexuais e hipertensão, usado para estudar o papel da testosterona na progressão da doença cardíaca hipertensiva.

Sabe-se que neste modelo de hipertensão, o SRAA se apresenta com uma atividade aumentada assumindo um papel relevante na fisiopatologia da hipertensão arterial e em outras doenças cardiovasculares. No que diz respeito ao coração, várias efeitos hemodinâmicos e humorais têm sido associadas à ativação do SRAA, como isquemia miocárdica, hipertrofia ventricular esquerda, arritmias e aumento do estresse oxidativo (GAVRAS I, 1998).

No estudo de Dalpiaz e colaboradores (2015) foi demonstrado que animais machos SHR de 3 meses de idade, com 7 semanas de orquiectomia apresentaram uma redução na atividade da ECA e ECA 2 no coração, sugerindo que a interação testosterona / SRA possivelmente existe e que em animais SHR a deficiência de testosterona pode causar uma redução na atividade do SRAA por alterar a atividade de importantes componentes das vias SRA (DALPIAZ et al., 2015).

Em outro estudo realizado por Jay S. Mishra e colaboradores (2016), também mostram essa importante relação da testosterona com o SRA, onde demonstraram que ratos wistar castrados por 12 semanas apresentaram redução na expressão dos receptores AT1 e um aumento nos Receptores AT2, reduzindo a relação AT1R/AT2R nas artérias mesentérica e uma redução de angiotensina circulante. Esses mesmos autores atribuem a redução da pressão arterial observado nesse estudo a essa redução na relação AT1R/AT2R, que se encontra alta na presença da testosterona (MISHRA; HANKINS; KUMAR, 2016).

Visto isso, investigamos como a inibição do AT1R poderia prevenir as alterações na contratilidade imposta pela orquiectomia encontrada no presente trabalho. O uso de fármacos cujo o efeito resulta na inibição da atividade de SRA tem sido utilizado para o tratamento da hipertensão e outras doenças cardiovasculares como a hipertrofia cardíaca do ventrículo esquerdo e doenças vasculares com benefícios na morbidade e na mortalidade cardiovascular (SICA; GEHR, 1999).

Junto a isso, avaliamos igualmente, a participação dos PPAR- γ , que foi demonstrado em alguns estudos estar envolvidos no controle da expressão do gene da renina (TODOROV et al., 2007), bem como na expressão do receptor AT1 (SUGAWARA, A., TAKEUCHI, K., URUNO, A., IKEDA, Y., ARIMA, S., KUDO, M., 2001), conferindo propriedades metabólicas benéficas em pacientes hipertensos.

Para tal, foi feito uso do telmisartan, fármaco que nos permitiu conjuntamente o bloqueio dos receptores AT1 e a ativação parcial dos PPAR- γ .

Como podemos perceber pela figura 7, nos músculos papilares de animais tratados com telmisartan, a redução na resposta ao cálcio e a ativação beta adrenérgica foi prevenida por este fármaco. De forma semelhante, quando mensuramos de forma indireta o influxo transsarcolemal de cálcio pelo PRC, o mesmo foi aumentado. Ainda, segundo a figura 7, podemos perceber que a expressão de proteínas importantes envolvidas no ciclo do cálcio foram alteradas no grupo OQT+Tel. A expressão da SERCA se manteve inalterada, porém o NCX e o PBL total tiveram a sua expressão reduzida.

Estes dados sugerem que o tratamento com telmisartan além de melhorar o influxo de cálcio, pode estar aumentando o conteúdo de cálcio no RS, decorrente da maior atividade da SERCA.

A redução de NCX se traduz numa menor extrusão de cálcio pelo sarcolema e a redução do PBL, um polipetídeo que possui a função de modular a atividade da bomba responsável por recaptar o cálcio para o RS (SERCA), perfaz um cenário onde haverá uma maior disponibilidade de cálcio mioplasmático frente a uma SERCA mais eficiente. Entretanto, quando avaliamos de forma indireta a recaptação de cálcio pelo RS pelo PPP, a mesma se manteve inalterada.

O PPP é um indicativo indireto da função do RS em recaptar, armazenar e liberar Cálcio em balanço aos mecanismos responsáveis pela extrusão do cálcio. Entretanto, a forma indireta de avaliação empregada pode sofrer influência de outros mecanismos intracelulares, o que pode ter nos impedido de achar esse aumento no PPP, evidenciando esse incremento de cálcio no RS.

Esse conjunto de dados sugerem, mais uma vez, a importante relação deficiência testosterona/ SRA na instauração de alterações importantes no sistema cardiovascular. Além disso, mostra igualmente que em um quadro de hipertensão juntamente com privação hormonal, o uso de um antagonista do SRA pode trazer benefícios na função contrátil do coração, possivelmente prejudicada pela falta de hormônio.

É sabido que o alvo molecular direto para todos os efeitos do SRA, são os receptores da angiotensina, dos quais existem os subtipos 1 e 2 que possuem respostas

contrárias nas suas vias de sinalização (DE GASPARO et al., 2000). Em tese, a estimulação de receptores AT2 contrabalança boa parte dos efeitos deletérios da estimulação de receptores AT1. No entanto, a expressão desse receptor é bastante discreta em relação ao receptor AT1, estando presente principalmente na vida fetal (CHUNG; UNGER, 1999).

Assim sendo, no presente estudo foi investigado a expressão do receptor AT1 em todos os grupos estudados, por mediar a grande maioria dos efeitos deletérios da Ang II. Nota-se que em ratos OQT não houve alteração da expressão protéica de AT1R, sugerindo que o efeito da testosterona sobre o SRA em SHR OQT provavelmente não ocorre por alteração do número de receptores AT1 (Figura 7H).

No entanto o número desses receptores foi aumentado apenas no grupo OQT tratado com telmisartan (Figura 7H). Cremos que esse aumento no número dos receptores AT1 observado no grupo OQT+Tel pode ter acontecido mediante um feedback positivo a uma inibição prolongada desses receptores.

Todavia, esse acréscimo nos receptores AT1 constatada no grupo OQT+Tel, associado a um provável aumento na produção de angiotensina II, não impediu o telmisartan de prevenir o prejuízo na contratilidade posta pela OQT encontrada nos nossos achados.

Outro achado pertinente é o fato desses receptores AT1 terem sido mais expressos apenas no grupo OQT+tel. Quando usamos o inibidor de PPAR- γ no grupo OQT+Tel+BADGE a expressão desses receptores não foi alterada. Esse resultado sugere que o feedback positivo observado no grupo OQT+tel, provavelmente, depende da ativação dos PPAR- γ , sendo que, quando o efeito do telmisartan é exclusivo no antagonismo dos receptores AT1, a expressão dos mesmos se manteve inalterado.

Em um estudo pioneiro Ikuyo Imayama e colaboradores (2006) demonstram que o tratamento com telmisartan causa downregulation de receptores AT1 em cultura de células de músculo liso pela ativação do PPAR- γ (IMAYAMA et al., 2006). No nosso achado a ativação do PPAR- γ conjuntamente com a inibição dos receptores AT1 pelo telmisartan apresentou um cenário diferente desse estudo, onde se observou um upregulation dos receptores AT1.

Assim sendo, uma conclusão possível é que realmente poderá existir uma relação entre a ativação do PPAR- γ e a expressão dos receptores de AT1, entretanto, ao que tudo indica, a expressão dessa relação dependerá da interação de vários fatores como, modelo de estudo, tipo de tecido estudado ou da fisiopatologia a ser tratada.

Nosso estudo pode estar em acordo com os estudos aqui apresentados, que demonstraram que a deficiência de testosterona pode reduzir o angiotensinogênio produzido no fígado e atividade da renina sem alterar a expressão dos receptores AT1. Contudo no nosso estudo, além da mensuração dos receptores AT1, não foi feita a avaliação de outros componentes da via SRAA.

O telmisartan vem sendo utilizado em muitos trabalhos para estudar as múltiplas alterações causadas por doenças como, hipertensão, diabetes, infarto do miocárdio e doença arterial coronariana (CADEDDU et al., 2010; SHARMA et al., 2014; VERDECCHIA et al., 2011). Apesar disso, quando se trata da função cardíaca, poucos estudos mostram o efeito do telmisartan na contratilidade miocárdica o que destaca ainda mais a importância do nosso estudo.

Nosso modelo de estudo mimetiza um homem adulto hipertenso com deficiência na produção de testosterona, principal hormônio masculino. Com a idade avançada há uma redução progressiva na produção de testosterona o que aumenta a prevalência de doenças cardiovasculares em homens (DARIUSH MOZAFFARIAN et al., 2016).

O único estudo que demonstra o efeito do telmisartan na contratilidade foi realizada por Mustafa Emre e colaboradores (2009), com músculos papilares isolados de ratos wistar diabéticos onde demonstram que a exposição ao telmisartan por 8 semanas melhorou a contratilidade, restaurando TTP e tempos de relaxamento (TR50%), indicando que a ação do telmisartan tem efeitos no manejo do cálcio no músculo cardíaco (EMRE; KAVAK; UNLUGENC, 2010).

O telmisartan é o último dos antagonistas dos receptores AT1 com propriedades farmacológicas ímpares definida por uma longa duração de ação e alta lipofilicidade (DEROSA et al., 2004). Possui, também, propriedades agonísticas parciais de PPAR- γ (uma superfamília de receptores nucleares de fatores de transcrição) que podem conferir propriedades cardiometabólicas benéficas em pacientes hipertensos ou ratos, como mencionado na Introdução (BENSON SC, PERSHADSINGH HA, HO CI, 2004).

A ativação de PPAR- γ regula a ativação da proteína-1, o transdutor e ativador de sinal de transcrição e da via da NF- κ B, inibindo mais ainda a produção de mediadores e citosinas pró-inflamatórias, atenuando o estresse oxidativo, e a a inflamação (MERSMANN et al., 2008). Segundo alguns estudos, a ativação de PPAR- γ aparenta ser um mecanismo inovador para mediar os efeitos benéficos dos receptores da angiotensina (BENSON SC, PERSHADSINGH HA, HO CI, 2004; GOYAL, Sameer et al., 2010; IKEJIMA et al., 2008).

Posto isso, o passo seguinte do nosso estudo foi examinar a participação do PPAR- γ na prevenção da queda de contratilidade observado no tratamento com o telmisartan. Para tal fim, foi criado um grupo onde os ratos orquiectomizados foram tratados com telmisartan mais um inibidor de PPAR gama (OQT+ Tel +BADGE). Com o efeito do telmisartan apenas no bloqueio dos receptores do AT1 também houve uma prevenção da queda da contração em músculos papilares isolados de SHR OQT, das derivadas positivas e negativas, com uma redução no tempo de ativação e um tempo de relaxamento inalterado (Figura 5).

Curiosamente, quando mensuramos a resposta inotrópica ao cálcio, ativação beta adrenérgica e, indiretamente, o influxo transsarcolemal de cálcio (através da *PRC*), além de prevenir a queda observada no OQT, essas respostas foram aumentadas em relação ao grupo sham e ao próprio grupo OQT+Tel, sugerindo que o efeito do telmisartan na prevenção da perda de contratilidade presente no grupo OQT é maior quando o efeito é exclusivo no bloqueio dos receptores AT1 (Figura 7). E ainda, quando avaliamos indiretamente a recaptação do cálcio pelo RS pelo protocolo PPP citado acima, esse grupo apresentou uma redução na potenciação da força relativa após as pausas comparado com os demais grupos.

De fato, esse grupo (tel + BADGE) apresentou maior expressão de NCX e uma redução do PLB total sem alteração na expressão da PBL ser¹⁶ e da SERCA 2. Esses dados juntos indicam que, embora tenha uma redução no PBL, com uma expressão normal da SERCA, indicando uma SERCA mais ativa, o cálcio provavelmente está sendo extrudado principalmente pelo sarcolema em vez de ser recaptado pelo RS, o que pode ter reduzido essa potenciação após pausa presente no grupo OQT+Tel+BADGE.

Esse upregulation de NCX, reduzindo a recaptação do cálcio pelo RS pode ter sido um mecanismo reflexo a esse aumento grande de influxo de cálcio. O cálcio é um íon em maior abundância no meio extracelular e a sua presença em grande quantidade no meio intracelular pode desencadear vários outros mecanismos deletérios para o coração, como a ativação de vias apoptóticas e saturação do RS com possibilidade de arritmia decorrente de emissões espontâneas de cálcio do RS (BERS, 2002). Assim sendo esse upregulation do NCX pode ter sido um mecanismo compensatório a esse incremento de cálcio intracelular.

Ainda nesse contexto, assumimos que esse aumento do influxo de cálcio transsarcolemal observado, avaliado pelo protocolo *PRC*, seja o protagonista de todos os resultados encontrados com o co-tratamento telmisartan e o BADGE. Esse co-tratamento aumentou em 110% a *PRC*, o que provocou um incremento nas respostas

inotrópicas avaliadas (respostas ao incremento de cálcio e ativação beta adrenérgica) acima do grupo OQT tratado só com telmisartan (Figura 7).

Essa conclusão ganha mais peso ainda quando olhamos o comportamento da curva de cálcio, onde houve um aumento na responsividade ao cálcio nas doses iniciais, porém, sem alteração na resposta máxima (Figura 7A). Dado que a responsividade ao cálcio envolve a entrada de cálcio pelo sarcolema e a saturação dos sítios de ligação de cálcio no sarcômero, este conjunto de dados sugere que o efeito do co-tratamento com telmisartan e o BADGE realmente ocorre principalmente pelo aumento do influxo de cálcio sem alterar a sensibilidade de proteínas contráteis (Figura 7C). Entretanto para a confirmação desses resultados experimentos adicionais mais específicos, como a avaliação de atividade dos canais de cálcio tipo L pelo patch clamp e do transiente de cálcio, são necessários e não foram realizadas no presente estudo.

No coração, como já citado acima, o cálcio desempenha um papel chave no acoplamento excitação-contração cardíaca, o processo pelo qual ocorre a contração dos miócitos em resposta à estimulação elétrica (BERS, 2002). Nos miócitos cardíacos, o ciclo contrátil é iniciado pela entrada de cálcio via canais de cálcio do tipo L ativados por voltagem.

Esse influxo transsarcolemal de cálcio desencadeia a abertura dos receptores de rianodina (RyRs), através dos quais grandes quantidades desse íon são liberadas do RS, um processo denominado liberação de Cálcio induzida por Cálcio. Com isso, a concentração de Ca^{2+} no citosol varia de aproximadamente 10^{-7} M no repouso até 10^{-5} M durante o potencial de ação (BERS; SHANNON, 2013).

O Ca^{2+} disponível no citoplasma se liga às proteínas contráteis para disparar a contração. Durante a diástole, o cálcio se desassocia dos miofilamentos e é recaptado de volta ao RS pela SERCA e para o meio extracelular pelo NCX o que leva ao relaxamento do músculo. (BERS; SHANNON, 2013).

No nosso trabalho a inibição do PPAR- γ pelo BADGE, sugere um aumento do influxo de cálcio transsarcolemal avaliada de forma indireta, onde observou-se aumento de 39% da PRC, do tratamento só com telmisartan, para 110%, ou seja, um incremento de 71% da PRC, sugerindo aumento no influxo de cálcio (Figura 7C).

Esse achado nos permite inferir que o principal efeito da ativação do PPAR- γ , pelo telmisartan, na contratilidade de ratos SHR OQT, supostamente, seja a modulação da função dos canais de cálcio do tipo L no cardiomiócito. No nosso trabalho, possivelmente a ativação desses receptores pelo telmisartan atenua o influxo de cálcio pelo sarcolema, dado que, a sua inibição provocou um aumento de 71% da PRC. Heppner TJ e

colaboradores (2005) demonstram que a ativação desses receptores pela pioglitazona e outros agonistas do PPAR- γ diminui a função do canal de cálcio em células musculares lisas recém-isoladas de artéria mesentérica (HEPPNER et al., 2005).

Todavia em um estudo com cardiomíocitos isolados de neonatos foi demonstrado que o tratamento com telmisartan atenua a expressão de canais de cálcio do tipo L e que essa atenuação poderá ser independente da ativação do PPAR- γ (MORISHIMA et al., 2009).

Contudo, alguns estudos indicam que os resultados obtidos da ativação do PPAR- γ são complexos, com efeitos adversos e benéficos, sem os mecanismos esclarecidos, o que o torna importante estudar os efeitos dos agonistas do PPAR- γ sob diferentes condições patológicas (LEE, Ting-I et al., 2013; NISSEN, 2007; VIDAL-PUIG et al., 1996).

Esse aumento de PRC, sugestivo de um aumento de influxo transsarcolemal de cálcio, observado com o efeito exclusivo nos receptores AT1(OQT+Tel+ BADGE) poderá não ser um efeito benéfico para o coração dos ratos SHR OQT. A presença de aumento do cálcio intracelular também desempenha um papel importante em fisiopatologia como as arritmias, isquemia e insuficiência cardíaca.

O cálcio acumulado no citosol causa um inchaço nas mitocôndrias que pode participar da produção de ROS, morte celular programada e a necrose no infarto agudo do miocárdio e na isquemia (WEBSTER, 2012). E ainda, esse acúmulo de cálcio pode provocar saturação do RS e assim, instaurar um quadro de arritmia cardíaca devido a emissões espontâneas de cálcio (BERS, 2002).

Em razão disso, sugerimos que nesse presente estudo realizado em ratos hipertensos com deficiência de testosterona, a ativação do PPAR- γ pelo telmisartan desempenha um papel benéfico, atenuando a entrada de cálcio pelos canais de cálcio do tipo L, impedindo assim, a instauração de um quadro de sobrecarga de cálcio.

Ademais, podemos perceber pelos nossos resultados que, esse mesmo grupo OQT+Tel+ BADGE a expressão do NCX foi aumentada. Acreditamos que essa upregulation de NCX encontrada nesse grupo já foi um mecanismo ativado como forma de extrusão desse cálcio em excesso na tentativa de evitar essa sobrecarga de cálcio. Outrossim, estudos demonstram que um aumento na atividade do NCX, também, contribui para o aparecimento dessas doenças sendo ele o denominador comum na mediação das fisiopatologias mencionadas acima (POTT; ECKARDT; GOLDBERGER, 2011).

Em certas condições, o modo de transporte de cálcio pelo NCX pode ser invertido, onde a função de extrusão de cálcio pelo sarcolema é trocado pelo de influxo de cálcio

(LEBLANC; HUME, 1990; LIPP; NIGGLI, 1994). Assim, na presença de sódio intracelular aumentado, presente normalmente nessas doenças, a extrusão de cálcio é reduzida ou até mesmo invertida, de modo que passa a ter extrusão de sódio e um influxo de cálcio, participando assim do acúmulo de cálcio citosólico (LARBIG et al., 2010).

Evidências, portanto, reforçam a nossa ideia de que ativação do PPAR- γ no nosso estudo pelo telmisartan desempenha um papel benéfico, já que, com a sua inibição o coração teve que recrutar um mecanismo para impedir uma alteração importante (sobrecarga de cálcio) que em dado momento pode vir, de forma semelhante, a contribuir para o aparecimento dessa mesma alteração.

Dessa forma, corroborando com estudos citados aqui, que a ativação de PPAR- γ seja um mecanismo inovador para mediar os efeitos benéficos dos receptores da angiotensina. (BENSON SC, PERSHADSINGH HA, HO CI, 2004; GOYAL, Sameer et al., 2010; IKEJIMA et al., 2008).

Ademais, ao que tudo indica, todos esses nossos achados não têm relação com a quantidade de receptores PPAR- γ presentes no coração, uma vez que, quando investigamos a expressão desses receptores no coração nem a orquiectomia e nem a própria inibição pelo BADGE foi capaz de alterar a expressão proteica desse receptor (figura 7 I). PPAR γ é expresso em uma ampla variedade de tecidos, incluindo coração, cólon, intestino delgado e grosso, rins, pâncreas e baço (FAJAS et al., 1997).

Fármacos cujo o efeito é ativação desses receptores vem sendo utilizadas na prática clínica, no tratamento de doenças como aterosclerose, diabetes tipo 2 e hipertensão (KERSTEN; DESVERGNE; WAHLI, 2000; TAVARES V, HIRATA RDC, 2003). No nosso trabalho apresentamos alguns resultados que sugerem que a presença e a ativação dos PPAR- γ no coração pode influenciar em como esse órgão se comporta em algumas fisiopatologias que venha, de alguma forma, alterar o seu funcionamento normal.

Conhecidamente, os hormônios sexuais, em especial a testosterona, e o SRA também tem em comum a capacidade de induzir alterações na morfologia cardíaca e esta, por sua vez, tem influência na função contrátil do miocárdio. A hipertrofia cardíaca constitui-se num mecanismo em que a massa cardíaca é aumentada em resposta a um aumento de sua atividade ou de sobrecarga funcional (FEL, 1993; JALIL et al., 1989; WEBER et al., 1990).

A hipertrofia ventricular esquerda é um dos mais importantes fatores de riscos para doenças cardiovasculares. Em nossos achados, a orquiectomia não alterou o peso dos corações de ratos, assim como não teve efeito no conteúdo de colágeno (tabela1, figura

8). Contudo, o perímetro e a área nuclear foram reduzidos, sugerindo que neste presente estudo a deficiência de testosterona reduziu o trofismo cardíaco, porém sem reduzir deposição de colágeno.

Este resultado sugere ainda que as alterações na força desenvolvida e nos mecanismos envolvidos em sua geração são independentes de alteração morfológica. Corroborando com esses achados, Dalpiaz e colaboradores (2015) demonstram que SHR machos com 7 semanas de OQT, igualmente, apresentaram uma redução na hipertrofia cardíaca (DALPIAZ et al., 2015). Jay S. Mishra e colaboradores (2016) demonstram também que a orquiectomia pode ter relação com a deposição de colágeno no coração. Neste estudo demonstram que 28 dias de castração foi capaz de reduzir a fibrose cardíaca pela redução da deposição de colágeno, entretanto, diferentemente do presente estudo, foi realizado em ratos machos wistar (MISHRA; HANKINS; KUMAR, 2016).

Diversas evidências indicam que a Ang II é um fator determinante para estimular a hipertrofia de cardiomiócitos, proliferação de fibroblastos e produção de matriz extracelular na remodelação do VE (ZHAO et al., 2010). Além disso, já é demonstrado similarmente que na hipertrofia cardíaca patológica há um aumento da expressão dos componentes do SRAA, compreendendo a enzima conversora de angiotensina (ECA), o angiotensinogênio e o receptor AT1 (MILL et al., 1998). Já existe evidência que a deficiência de testosterona possui a capacidade de reduzir a hipertrofia e fibrose cardíaca precisamente por reduzir a atividade do SRA. Estes estudos demonstram que na presença de testosterona há uma maior produção de renina e angiotensinogênio e um aumento na relação AT1R/AT2R vascular, principais receptores deste sistema, aumentando a atividade do referido sistema (MISHRA; HANKINS; KUMAR, 2016; JAMES, G D et al., 1986; CHEN; NAFTILAN; OPARIL, 1992). Assim sendo, achamos que essa redução na área e no perímetro nuclear sugestivo de uma redução da hipertrofia no nosso estudo, seja pela redução na atividade do SRA, mesmo sem ter alterado a expressão dos receptores AT1 no coração.

Todavia, o grupo tratado com telmisartan apresentou uma diminuição do peso dos ratos OQT, peso dos corações, uma redução ainda mais da área e do perímetro nuclear (Tabela 1), sem alterar a quantidade de colágeno (figura 8), sugerindo que o efeito da testosterona sobre o SRA pode contribuir para o aparecimento da referida hipertrofia cardíaca e que, igualmente, o seu bloqueio do SRAA pode prevenir e/ou reverter tal alteração.

Um dos principais objetivos do tratamento da hipertensão é impedir ou melhorar danos nos principais órgãos-alvo. Uma das manifestações mais predominante de danos de órgãos-alvo na hipertensão é o desenvolvimento de hipertrofia e fibrose ventricular esquerda (KOREN et al., 1991). No nosso estudo demonstramos que o telmisartan, mesmo não tendo reduzido o colágeno, possui a capacidade de prevenir uma hipertrofia cardíaca.

Essa capacidade é relatada em um outro estudo realizado em ratos wistar submetidos a hipertrofia cardíaca pelo uso de isoproterenol, no qual foi demonstrado, de igual forma, que o tratamento com telmisartan via oral por 20 dias foi capaz de reduzir a hipertrofia (GOYAL, Bhoomika R; MEHTA, 2012). E ainda, Xiao-Cong Zeng e colaboradores (2013) demonstram que o telmisartan é eficiente na proteção contra a disfunção microvascular durante a lesão de isquemia / reperfusão miocárdica por ativação do PPAR- γ em coelhos submetidos a 60 minutos de isquemia pela oclusão da artéria coronária (ZENG; LI; WEN, 2013).

Estudos clínicos demonstram que o bloqueio do SRA causa regressão da hipertrofia e da fibrose cardíaca de forma mais eficaz do que outras classes de agentes anti-hipertensivos com níveis semelhantes de controle da pressão arterial (DEVEREUX et al., 2004; MATHEW et al., 2001; SCHMIEDER; MARTUS; KLINGBEIL, 1996).

Curiosamente, no presente estudo, embora a relação peso do coração / comprimento da tíbia no grupo tratado com telmisartan mais BADGE não foi alterada, a quantidade de colágeno foi menor quando comparado ao grupo sham. Ainda mais interessante, esse grupo apresentou maior massa cardíaca e tamanho nuclear. Acreditamos que este resultado esteja relacionado com o aumento da expressão proteica dos receptores AT1 observada no grupo apenas com telmisartan.

A upregulation dos receptores de AT1 pode ter deixado receptores livres e isso pode ter prevenido uma redução significativa do conteúdo de colágeno, observado no grupo BADGE. Já é demonstrado que antagonistas de receptores AT1 aumentam de forma reflexa a produção de Angio II, e com esses receptores AT1 livres, a Angio II pode estar agindo sobre eles impedindo o caimento deste colágeno.

O principal achado do presente estudo revela que o tratamento com telmisartan por 8 semanas normaliza a pressão arterial em ratos SHR OQT e conjuntamente previne a queda da contratilidade de músculos papilares isolados imposta pela orquiectomia. Esse efeito parece estar relacionado com um aumento no fluxo transarcolemal de cálcio, com consequente aumento nas respostas inotrópicas do coração (ativação beta adrenérgica e resposta das proteínas contráteis), sem alteração na atividade do RS. E ainda, sugere-

se também que o efeito parcial na ativação do PPAR- γ pelo telmisartan possivelmente, desempenha um papel importante nessa prevenção da queda contratilidade de músculos papilares de ratos SHRs OQT pelo seu efeito de atenuar esse influxo transsarcolemal de cálcio, impedido um incremento intracelular de cálcio acima do normal e assim o aparecimento de uma sobrecarga de cálcio. Mediante estas informações, a importância desse estudo reside no fato de avaliar e tornar mais conhecido o efeito do telmisartan sobre a contratilidade cardíaca. O uso de fármacos antagonistas dos receptores AT1 tem sido muito usado para o tratamento de inúmeras fisiopatologias como a hipertensão e hipertrofia do ventrículo esquerdo. Com o nosso estudo criamos mais evidências que demonstram que a ativação dos PPAR- γ pode contribuir para os efeitos benéficos apresentados pela inibição do SRAA em doenças como a hipertensão e situações de privação hormonal. É importante ressaltar que a deficiência de testosterona é uma realidade entre homens acima dos 40 anos constituindo um sério problema de saúde pública pelo fato de ser um preditor de várias doenças cardiovasculares importantes.

7. CONCLUSÃO:

No presente trabalho, demonstramos que o prejuízo na contratilidade de músculos papilares isolados de ratos espontaneamente hipertensos e orquidectomizados, é prevenida pelo tratamento por 8 semanas com telmisartan. Sugere-se que o mecanismo envolvido na prevenção da queda de contratilidade observadas nesses animais se deve, pela menos em parte a redução da sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio e a resposta Beta adrenérgica, sem alterar, no entanto, a função do RS e o influxo transarcolemal de cálcio. Portanto, os dados do presente estudos sugerem que o telmisartan se constitui uma forma eficiente para a prevenção dos prejuízos que a falta de testosterona e a hipertensão possa causar na contratilidade cardíaca. E ainda por último, foi demonstrado também que a capacidade de ativar parcialmente o PPAR- γ pelo telmisartan pode agregar benefícios no tratamento com o referido fármaco

8. REFERÊNCIAS

- AHTIAINEN, Juha P et al. Heavy resistance exercise training and skeletal muscle androgen receptor expression in younger and older men. **Steroids**, v. 76, n. 1–2, p. 183–92, 2011.
- ANASTOS, K et al. Hypertension in women: what is really known? The Women's Caucus, Working Group on Women's Health of the Society of General Internal Medicine. **Annals of internal medicine**, v. 115, n. 4, p. 287–93, 1991.
- ANGHEL, Silvia I; WAHLI, Walter. Fat poetry: a kingdom for PPAR γ . **Cell Research**, v. 17, n. 6, p. 486–511, 2007.
- AYAZ, Omar; HOWLETT, Susan Ellen. Testosterone modulates cardiac contraction and calcium homeostasis: cellular and molecular mechanisms. **Biology of sex differences**, v. 6, n. 1, p. 9, 2015.
- BACHMANN, H et al. [Blood pressure in children and adolescents aged 4 to 18. Correlation of blood pressure values with age, sex, body height, body weight and skinfold thickness (Essen Blood Pressure Study)]. **Monatsschrift Kinderheilkunde : Organ der Deutschen Gesellschaft fur Kinderheilkunde**, v. 135, n. 3, p. 128–34, 1987.
- BARP, J et al. Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 35, n. 9, p. 1075–81, 2002.
- BARRETOS-CHAVES MLM. Sistema Renina-Angiotensina. In: **Aires MM, Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koog**, p. 784–792, 2012.
- BASSANI, J W; BASSANI, R A; BERS, D M. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. **The Journal of physiology**, v. 476, n. 2, p. 279–93, 1994.
- BENSINGER, Steven J.; TONTONOZ, Peter. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 470–477, 2008.
- BENSON SC, PERSHADSINGH HA, HO CI, et al. . . Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPAR-gamma-modulating activity. **Hypertension**, v. 43, p. 993–1002, 2004.
- BERGER, Joel; MOLLER, David E. The mechanisms of action of PPARs. **Annual review of medicine**, v. 53, n. 1, p. 409–35, 2002.
- BERS, Donald M.; SHANNON, Thomas R. Calcium movements inside the sarcoplasmic reticulum of cardiac myocytes. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 58, n. 1, p. 59–66, 2013.

BERS, Donald M. coupling. v. 415, n. January, 2002.

BEST, C. J.M. et al. Molecular Alterations in Primary Prostate Cancer after Androgen Ablation Therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 19, p. 6823–6834, 2005.

BHASIN, Shalender et al. Testosterone Therapy in Men with Androgen Deficiency Syndromes: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, n. 6, p. 2536–2559, 2010.

BIDOGGIA, H et al. Sex differences on the electrocardiographic pattern of cardiac repolarization: possible role of testosterone. **American heart journal**, v. 140, n. 4, p. 678–83, 2000.

BOOKOUT, Angie L et al. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 789–99, ago. 2006.

BROSNIHAN, K B; LI, P; FERRARIO, C M. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 27, n. 3 Pt 2, p. 523–8, 1996.

CADEDDU, Christian et al. Protective effects of the angiotensin II receptor blocker telmisartan on epirubicin-induced inflammation, oxidative stress, and early ventricular impairment. **American Heart Journal**, v. 160, n. 3, p. 487.e1-487.e7, 2010.

CALAGHAN, S C; BELUS, A; WHITE, E. Do stretch-induced changes in intracellular calcium modify the electrical activity of cardiac muscle? **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 82, n. 1–3, p. 81–95, jan. .

CAVASIN, Maria A et al. Estrogen and testosterone have opposing effects on chronic cardiac remodeling and function in mice with myocardial infarction. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 284, n. 5, p. H1560-9, maio 2003.

CHEN, Y F; MENG, Q C. Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats is androgen dependent. **Life sciences**, v. 48, n. 1, p. 85–96, 1991.

CHEN, Y F; NAFTILAN, A J; OPARIL, S. Androgen-dependent angiotensinogen and renin messenger RNA expression in hypertensive rats. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 19, n. 5, p. 456–63, 1992.

CHOU, T M et al. Testosterone induces dilation of canine coronary conductance and resistance arteries in vivo. **Circulation**, v. 94, n. 10, p. 2614–9, 15 nov. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8921808>>. Acesso em: 18 jun. 2019.

CHUNG, O; UNGER, T. Angiotensin II receptor blockade and end-organ protection. **American journal of hypertension**, v. 12, n. 12 Pt 1–2, p. 150S-156S, 1999.

COHN, J N et al. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. **The New England journal of medicine**, v. 311, n. 13, p. 819–

23, 1984.

COLBY, H D; SKELTON, F R; BROWNIE, A C. Testosterone-induced hypertension in the rat. **Endocrinology**, v. 86, n. 5, p. 1093–101, maio 1970.

CREDIT, Shontell L et al. Localization of cytokines in heart ventricular and apex tissues exposed to sustained delivery of AED, T, and DHT using a rat model. **Biomedical sciences instrumentation**, v. 38, p. 95–100, 2002a.

_____. Localization of cytokines in heart ventricular and apex tissues exposed to sustained delivery of AED, T, and DHT using a rat model. **Biomedical sciences instrumentation**, v. 38, p. 95–100, 2002b.

CROFTON, J T; SHARE, L. Gonadal hormones modulate deoxycorticosterone-salt hypertension in male and female rats. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 29, n. 1 Pt 2, p. 494–9, 1997.

DALPIAZ, P. L. M. et al. Sex Hormones Promote Opposite Effects on ACE and ACE2 Activity, Hypertrophy and Cardiac Contractility in Spontaneously Hypertensive Rats. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0127515, 2015.

DARIUSH MOZAFFARIAN, Dariush et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, v. 133, n. 4, p. e38-360, jan. 2016.

DART, D Alwyn et al. Visualising androgen receptor activity in male and female mice. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e71694, 2013.

DE GASPARO, M et al. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 3, p. 415–72, 2000.

DEROSA, Giuseppe et al. Effects of telmisartan compared with eprosartan on blood pressure control, glucose metabolism and lipid profile in hypertensive, type 2 diabetic patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled 12-month study. **Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension**, v. 27, n. 7, p. 457–64, 2004.

DEVEREUX, Richard B. et al. Regression of Hypertensive Left Ventricular Hypertrophy by Losartan Compared With Atenolol. **Circulation**, v. 110, n. 11, p. 1456–1462, set. 2004.

DIEP, Q. N., BENKIRANE, K., AMIRI, F., COHN, J. S., ENDEMANN, D., & SCHIFFRIN, E. L. PPAR alpha activator fenofibrate inhibits myocardial inflammation and fibrosis in angiotensin II-infused rats. **J Mol Cell Cardio**, v. 36, p. 295–304, 2004.

DIWAN, Abhinav; DORN, Gerald W. Decompensation of cardiac hypertrophy: cellular mechanisms and novel therapeutic targets. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 22, n. 1, p. 56–64, 2007.

DOGGRELL, S A; BROWN, L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. **Cardiovascular research**, v. 39, n. 1, p. 89–105, 1998.

DÓREA, E.L.; LOTUFO, P.A. Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica. Hipertensão. **Hipertensão**, v. 7, p. 86–89, 2004.

DRAZNER, Mark H. The Progression of Hypertensive Heart Disease. **Circulation**, v. 123, n. 3, p. 327–334, 2011.

DREYER, C et al. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. **Cell**, v. 68, n. 5, p. 879–87, 1992.

ELLISON, K E et al. Androgen regulation of rat renal angiotensinogen messenger RNA expression. **Journal of Clinical Investigation**, v. 83, n. 6, p. 1941–1945, 1989.

EMRE, Mustafa; KAVAK, Servet; UNLUGENC, Hakki. The effects of telmisartan on mechanical responses of left ventricular papillary muscle in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. **Acta Diabetologica**, v. 47, n. S1, p. 153–159, 2010.

ENGLISH, K M et al. Low-dose transdermal testosterone therapy improves angina threshold in men with chronic stable angina: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Circulation**, v. 102, n. 16, p. 1906–11, 2000.

ESCHENHAGEN, T et al. Long term beta-adrenoceptor-mediated up-regulation of Gi alpha and G(o) alpha mRNA levels and pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding proteins in rat heart. **Molecular pharmacology**, v. 42, n. 5, p. 773–83, 1992.

FAJAS, Lluís et al. The Organization, Promoter Analysis, and Expression of the Human PPAR γ Gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 30, p. 18779–18789, 1997.

FEIGE, Jérôme N et al. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. **Progress in lipid research**, v. 45, n. 2, p. 120–59, 2006.

FEL, Pereira. Hipertrofia cardíaca: aspectos morfológicos e patogénicos. In: Contratilidade miocárdica. Aspectos básicos e clínicos. **Editores Vassalle DV, e Lima EG (eds.). São Paulo, BYK**, v. 13–28, 1993.

FESTUCCIA, W. T. et al. PPAR γ agonism increases rat adipose tissue lipolysis, expression of glyceride lipases, and the response of lipolysis to hormonal control. **Diabetologia**, v. 49, n. 10, p. 2427–2436, 2006.

FESTUCCIA, William T. et al. The PPAR γ agonist rosiglitazone enhances rat brown adipose tissue lipogenesis from glucose without altering glucose uptake. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 296, n. 5, p. R1327–R1335, 2009.

FIEBACH, N H et al. A prospective study of high blood pressure and cardiovascular

disease in women. **American journal of epidemiology**, v. 130, n. 4, p. 646–54, 1989.

FROHLICH, E D. The adrenergic nervous system and hypertension state of the art. **Mayo Clinic proceedings**, v. 52, n. 6, p. 361–8, 1977.

FUCHS, F; SMITH, S H. Calcium, cross-bridges, and the Frank-Starling relationship. **News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society**, v. 16, p. 5–10, fev. 2001.

GANTEN U, SCHRODER G, WITT M, ZIMMERMAN F, GANTEN D, Stock G. Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats: effects of anti-androgen treatment. **J Hypertens**, v. 7, p. 721–726, 1989.

GAVRAS I, Gavras H. The reninangiotensin system in hypertensive cardiac disease. In: Ulfendahl HR, Aurell M (eds.), Renin-Angiotensin. **Ulfendahl HR, Aurell M (eds.), Renin-Angiotensin. A Centenary Symposium of the discovery of the renin-angiotensin system. Portland Press Ltd., London**, p. 265–72, 1998.

GILDE, A. J.; VAN BILSEN, M. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): regulators of gene expression in heart and skeletal muscle. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 178, n. 4, p. 425–434, 2003.

GOLDEN, Kish L et al. Gonadectomy alters myosin heavy chain composition in isolated cardiac myocytes. **Endocrine**, v. 24, n. 2, p. 137–40, 2004a.

_____. Gonadectomy alters myosin heavy chain composition in isolated cardiac myocytes. **Endocrine**, v. 24, n. 2, p. 137–40, 2004b.

_____. Gonadectomy of adult male rats reduces contractility of isolated cardiac myocytes. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 285, n. 3, p. E449-53, 2003.

GOLDEN, Kish L; MARSH, James D; JIANG, Yang. Castration reduces mRNA levels for calcium regulatory proteins in rat heart. **Endocrine**, v. 19, n. 3, p. 339–44, 2002.

GOYAL, Bhoomika R; MEHTA, Anita A. Beneficial role of spironolactone, telmisartan and their combination on isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. **Acta cardiologica**, v. 67, n. 2, p. 203–11, 2012.

GOYAL, Sameer et al. Modulation of PPAR-gamma by telmisartan protects the heart against myocardial infarction in experimental diabetes. **Chemico-biological interactions**, v. 185, n. 3, p. 271–80, maio 2010.

GRIENGLING, K K; MURPHY, T J; ALEXANDER, R W. Molecular biology of the renin-angiotensin system. **Circulation**, v. 87, n. 6, p. 1816–28, 1993.

GRIGORE, Daniela; OJEDA, Norma B; ALEXANDER, Barbara T. Sex differences in the

fetal programming of hypertension. **Gender medicine**, v. 5 Suppl A, p. S121-32, 2008.

HALL JE, BRANDS MJ, Henegar JR. Angiotensin II and long-term arterial pressure regulation: the overriding dominance of the kidney. **J Am Soc Nephrol**, v. 10, p. S258–S265., 1999.

HALL JE, GUYTON AC, Brands MJ. Control of sodium excretion and arterial pressure by intrarenal mechanisms and the renin-angiotensin system. In: Laragh JH, Brenner BM, eds. **Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. 2nd ed. New York, NY: Raven Press**, p. 1451–1475, 1995.

HARMON, Gregory S.; LAM, Michael T.; GLASS, Christopher K. PPARs and Lipid Ligands in Inflammation and Metabolism. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 6321–6340, 2011.

HARSHFIELD, G A et al. Ambulatory blood pressure recordings in children and adolescents. **Pediatrics**, v. 94, n. 2 Pt 1, p. 180–4, 1994.

HAYWARD, C S; KELLY, R P; COLLINS, P. The roles of gender, the menopause and hormone replacement on cardiovascular function. **Cardiovascular research**, v. 46, n. 1, p. 28–49, 2000.

HAYWOOD JR, Hinojosa-Laborde C. Sexual dimorphism of sodium-sensitive renal-wrap hypertension. **Hypertension**, v. 30, p. 667–671, 1997.

HEIN, Stefan et al. Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. **Circulation**, v. 107, n. 7, p. 984–91, fev. 2003.

HENNINGTON BS, HENEGAR L, SINNING AR, GRANGER JP, Reckelhoff JF. Localization of androgen receptors in the kidney of male rats. **Hypertension**, v. 30, p. 510., 1997.

HEPPNER, Thomas J. et al. Novel PPAR γ Agonists GI 262570, GW 7845, GW 1929, and Pioglitazone Decrease Calcium Channel Function and Myogenic Tone in Rat Mesenteric Arteries. **Pharmacology**, v. 73, n. 1, p. 15–22, 2005.

HORSTMAN, Astrid M et al. The role of androgens and estrogens on healthy aging and longevity. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v. 67, n. 11, p. 1140–52, nov. 2012.

IAMS, S G; WEXLER, B C. Retardation in the development of spontaneous hypertension in SH rats by gonadectomy. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 90, n. 6, p. 997–1003, 1977.

IGLARZ, Marc et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and receptor-gamma activators prevent cardiac fibrosis in mineralocorticoid-dependent hypertension.

Hypertension (Dallas, Tex. : 1979), v. 42, n. 4, p. 737–43, 2003.

IKEJIMA, Hideyuki et al. Effects of telmisartan, a unique angiotensin receptor blocker with selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-modulating activity, on nitric oxide bioavailability and atherosclerotic change. **Journal of hypertension**, v. 26, n. 5, p. 964–72, 2008.

IMAYAMA, I et al. Telmisartan downregulates angiotensin II type 1 receptor through activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ . **Cardiovascular Research**, v. 72, n. 1, p. 184–190, 2006.

ISSEMAN, Isabelle; GREEN, Stephen. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. **Nature**, v. 347, n. 6294, p. 645–650, 1990.

JALIL, J E et al. Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. **Circulation research**, v. 64, n. 6, p. 1041–50, 1989.

JAMES, Andrew F; CHOISY, Stéphanie C M; HANCOX, Jules C. Recent advances in understanding sex differences in cardiac repolarization. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 94, n. 3, p. 265–319, 2007.

JAMES, G D et al. Renin relationship to sex, race and age in a normotensive population. **Journal of hypertension. Supplement : official journal of the International Society of Hypertension**, v. 4, n. 5, p. S387-9, 1986.

JARRAR, D et al. Mechanisms of the salutary effects of dehydroepiandrosterone after trauma-hemorrhage: direct or indirect effects on cardiac and hepatocellular functions? **Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960)**, v. 135, n. 4, p. 416–22; discussion 422-3, 2000.

JONES, Richard D et al. Pulmonary vasodilatory action of testosterone: evidence of a calcium antagonistic action. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 39, n. 6, p. 814–23, 2002.

JONES, Richard D; HUGH JONES, T; CHANNER, Kevin S. The influence of testosterone upon vascular reactivity. **European journal of endocrinology**, v. 151, n. 1, p. 29–37, 2004.

JUUL, Anders; SKAKKEBAEK, Niels E. Androgens and the ageing male. **Human reproduction update**, v. 8, n. 5, p. 423–33, 2002.

KARILA, Tuomo. **Adverse effects of anabolic androgenic steroids on the cardiovascular , metabolic and reproductive systems of anabolic substance abusers**. [S.l: s.n.], 2003.

KATZ, F H; ROPER, E F. Testosterone effect on renin system in rats. **Proceedings of**

the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.), v. 155, n. 3, p. 330–3, 1977.

KAWAI, H et al. ACE inhibition improves cardiac NE uptake and attenuates sympathetic nerve terminal abnormalities in heart failure. **The American journal of physiology,** v. 277, n. 4, p. H1609-17, 1999.

KERSTEN, S; DESVERGNE, B; WAHLI, W. Roles of PPARs in health and disease. **Nature,** v. 405, n. 6785, p. 421–4, 2000.

KHOURY, S et al. Ambulatory blood pressure monitoring in a nonacademic setting. Effects of age and sex. **American journal of hypertension,** v. 5, n. 9, p. 616–23, 1992.

KOBORI, Hiroyuki et al. Enhanced intrarenal angiotensinogen contributes to early renal injury in spontaneously hypertensive rats. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN,** v. 16, n. 7, p. 2073–80, 2005.

KOMUKAI, Kimiaki; MOCHIZUKI, Seibu; YOSHIMURA, Michihiro. Gender and the renin-angiotensin-aldosterone system. **Fundamental & Clinical Pharmacology,** v. 24, n. 6, p. 687–698, 2010.

KOREN, M J et al. Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension. **Annals of internal medicine,** v. 114, n. 5, p. 345–52, mar. 1991.

KOTCHEN, J M; MCKEAN, H E; KOTCHEN, T A. Blood pressure trends with aging. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979),** v. 4, n. 5 Pt 2, p. III128-34, 1982.

LARBIG, Robert et al. Activation of reverse Na + -Ca 2+ exchange by the Na + current augments the cardiac Ca 2+ transient: evidence from NCX knockout mice. **The Journal of Physiology,** v. 588, n. 17, p. 3267–3276, 2010.

LAROUMANIE, Fanny et al. CD4+ T cells promote the transition from hypertrophy to heart failure during chronic pressure overload. **Circulation,** v. 129, n. 21, p. 2111–24, 2014.

LAUDET, V et al. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. **The EMBO journal,** v. 11, n. 3, p. 1003–13, 1992.

LEBLANC, N; HUME, J R. Sodium current-induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum. **Science (New York, N.Y.),** v. 248, n. 4953, p. 372–6, 1990.

LEE, Chih-Hao et al. Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta. **Science (New York, N.Y.),** v. 302, n. 5644, p. 453–7, 2003.

LEE, Ting-I et al. Rosiglitazone induces arrhythmogenesis in diabetic hypertensive rats with calcium handling alteration. **International Journal of Cardiology,** v. 165, n. 2, p. 299–307, 2013.

LEITE, C M; VASSALLO, D V; MILL, J G. Characteristics of tetanic contractions in

caffeine-treated rat myocardium. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 73, n. 5, p. 638–43, 1995.

_____. Post-rest contractions of amphibian cardiac muscle. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 24, n. 8, p. 843–6, 1991.

_____. The effect of verapamil on potentiated rest contractions in the rat ventricular myocardium. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 21, n. 4, p. 859–62, jan. 1988.

LEONETTI, G; CUSPIDI, C. The heart and vascular changes in hypertension. **Journal of hypertension. Supplement: official journal of the International Society of Hypertension**, v. 13, n. 2, p. S29-34, 1995.

LEVI, Roberto et al. Activation of a renin-angiotensin system in ischemic cardiac sympathetic nerve endings and its association with norepinephrine release. **International immunopharmacology**, v. 2, n. 13–14, p. 1965–73, 2002.

LINZ, W; SCHÖLKENS, B A. A specific B2-bradykinin receptor antagonist HOE 140 abolishes the antihypertrophic effect of ramipril. **British journal of pharmacology**, v. 105, n. 4, p. 771–2, 1992.

LIPP, P; NIGGLI, E. Sodium current-induced calcium signals in isolated guinea-pig ventricular myocytes. **The Journal of Physiology**, v. 474, n. 3, p. 439–446, fev. 1994.

LOOT, Annemarieke E et al. Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. **Circulation**, v. 105, n. 13, p. 1548–50, 2002.

MACMAHON, S et al. 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)**, v. 335, n. 8692, p. 765–74, 1990.

MALKIN, C J et al. Testosterone replacement in hypogonadal men with angina improves ischaemic threshold and quality of life. **Heart (British Cardiac Society)**, v. 90, n. 8, p. 871–6, 2004.

MÁLYUSZ, M; EHRENS, H J; WRIGGE, P. Effect of castration on the experimental renal hypertension of the rat. Blood pressure, nephrosclerosis, long-chain fatty acids, and N-acetylation of PAH in the kidney. **Nephron**, v. 40, n. 1, p. 96–9, 1985.

MANGELSDORF, D J et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell**, v. 83, n. 6, p. 835–9, 1995.

MARSH, J D et al. Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. **Circulation**, v. 98, n. 3, p. 256–61, jul. 1998.

MASUBUCHI, Y et al. Gonadectomy-induced reduction of blood pressure in adult spontaneously hypertensive rats. **Acta endocrinologica**, v. 101, n. 1, p. 154–60, 1982.

MATHEW, J et al. Reduction of cardiovascular risk by regression of electrocardiographic markers of left ventricular hypertrophy by the angiotensin-converting enzyme inhibitor ramipril. **Circulation**, v. 104, n. 14, p. 1615–21, 2001.

MATTSSON, L A et al. Lipid metabolism in women with polycystic ovary syndrome: possible implications for an increased risk of coronary heart disease. **Fertility and sterility**, v. 42, n. 4, p. 579–84, 1984.

MERSMANN, Jan et al. Rosiglitazone is cardioprotective in a murine model of myocardial I/R. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 30, n. 1, p. 64–8, 2008.

MILL, J G et al. Comparison of the contractile performance of the hypertrophied myocardium from spontaneous hypertensive rats and normotensive infarcted rats. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 76, n. 4, p. 387–94, 1998.

MILL, J G; VASSALLO, D V; LEITE, C M. Mechanisms underlying the genesis of post-rest contractions in cardiac muscle. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 25, n. 4, p. 399–408, 1992.

MISHRA, Jay S; HANKINS, Gary D; KUMAR, Sathish. Testosterone downregulates angiotensin II type-2 receptor via androgen receptor-mediated ERK1/2 MAP kinase pathway in rat aorta. **Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS**, v. 17, n. 4, out. 2016.

MITCHELL, Gary F et al. Pulse pressure and risk of new-onset atrial fibrillation. **JAMA**, v. 297, n. 7, p. 709–15, 2007.

MIZUNO, Y et al. Aldosterone production is activated in failing ventricle in humans. **Circulation**, v. 103, n. 1, p. 72–7, 2001.

MORALES, A; HEATON, J P; CARSON, C C. Andropause: a misnomer for a true clinical entity. **The Journal of urology**, v. 163, n. 3, p. 705–12, 2000.

MORISHIMA, Masaki et al. Telmisartan, an angiotensin II type 1 receptor antagonist, attenuates T-type Ca²⁺ channel expression in neonatal rat cardiomyocytes. **European Journal of Pharmacology**, v. 609, n. 1–3, p. 105–112, 2009.

MURPHY, G. J.; HOLDER, J. C. PPAR γ agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. **TIPS**, v. 21, n. 12, p. 469–474, 2000.

NAHRENDORF, M. Effect of testosterone on post-myocardial infarction remodeling and function. **Cardiovascular Research**, v. 57, n. 2, p. 370–378, fev. 2003.

NATIONAL HEART, LUNG, and Blood Institute. **Risk factors for high blood pressure.**

NISSEN, Steven E. Perspective: effect of rosiglitazone on cardiovascular outcomes. **Current cardiology reports**, v. 9, n. 5, p. 343–4, 2007.

OKAMOTO, K; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese circulation journal**, v. 27, p. 282–93, 1963.

OS, Ingrid et al. Effects of Losartan in Women With Hypertension and Left Ventricular Hypertrophy. **Hypertension**, v. 51, n. 4, p. 1103–1108, 2008.

LOUDAR, O et al. Differences in rat kidney morphology between males, females and testosterone-treated females. **Renal physiology and biochemistry**, v. 14, n. 3, p. 92–102, 1991.

PENDERGRASS, Karl D et al. Sex differences in circulating and renal angiotensins of hypertensive mRen(2). Lewis but not normotensive Lewis rats. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 295, n. 1, p. H10-20, 2008.

PEREIRA, Marta et al. Differences in prevalence, awareness, treatment and control of hypertension between developing and developed countries. **Journal of hypertension**, v. 27, n. 5, p. 963–75, maio 2009.

POCOCK G, Richards CD. Human physiology: the basis of medicine. 3 rd ed. **Oxford: Oxford University Press**, 2006.

POTT, Christian; ECKARDT, Lars; GOLDBERGER, Joshua I. Triple threat: the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in the pathophysiology of cardiac arrhythmia, ischemia and heart failure. **Current drug targets**, v. 12, n. 5, p. 737–47, 2011.

POTTS, Jeffrey T.; MCKEOWN, Kelly P.; SHOUKAS, Artin A. Reduction in arterial compliance alters carotid baroreflex control of cardiac output in a model of hypertension. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 274, n. 4, p. H1121–H1131, 1998.

RAJAGOPALAN, S et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. **The Journal of clinical investigation**, v. 97, n. 8, p. 1916–23, 15 abr. 1996.

RAMBOURG, A; SEGRETAIN, D. Three-dimensional electron microscopy of mitochondria and endoplasmic reticulum in the red muscle fiber of the rat diaphragm. **The Anatomical record**, v. 197, n. 1, p. 33–48, 1980.

RECKELHOFF, J F. Gender differences in the regulation of blood pressure. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 37, n. 5, p. 1199–208, 2001.

RECKELHOFF, J F; ZHANG, H; GRANGER, J P. Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**

(Dallas, Tex. : 1979), v. 31, n. 1 Pt 2, p. 435–9, 1998.

RECKELHOFF JF, FORTEPIANI LA, ZHANG H, SRIVASTAVA K, Smith MJ. Gender differences in the response of SHR to acute and chronic superoxide dismutase mimetic, TEMPOL. **Am J Hypertens**, v. 13:277A, p. 277Abstrac, 2000.

REGITZ-ZAGROSEK, Vera et al. Sex and gender differences in myocardial hypertrophy and heart failure. **Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society**, v. 74, n. 7, p. 1265–73, 2010.

RIBEIRO JÚNIOR, R F et al. Testosterone deficiency prevents left ventricular contractility dysfunction after myocardial infarction. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 460, p. 14–23, 2018.

RINGER, S. A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. **The Journal of physiology**, v. 4, n. 1, p. 29-42.3, 1883.

RIZZO, Giovanni; FIORUCCI, Stefano. PPARs and other nuclear receptors in inflammation. **Current opinion in pharmacology**, v. 6, n. 4, p. 421–7, 2006.

ROBINSON, Emma; GRIEVE, David J. Significance of peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system in health and disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 122, n. 3, p. 246–263, 2009.

ROSSI, C S; LEHNINGER, A L. STOICHIOMETRY OF RESPIRATORY STIMULATION, ACCUMULATION OF CA⁺⁺ AND PHOSPHATE, AND OXIDATIVE PHOSPHORYLATION IN RAT LIVER MITOCHONDRIA. **The Journal of biological chemistry**, v. 239, p. 3971–80, 1964.

ROWLAND, N E; FREGLY, M J. Role of gonadal hormones in hypertension in the Dahl salt-sensitive rat. **Clinical and experimental hypertension. Part A, Theory and practice**, v. 14, n. 3, p. 367–75, 1992.

SANTOS, Paulo Caleb Junior Lima; KRIEGER, Jose Eduardo; PEREIRA, Alexandre Costa. Renin-angiotensin system, hypertension, and chronic kidney disease: pharmacogenetic implications. **Journal of pharmacological sciences**, v. 120, n. 2, p. 77–88, 2012.

SATHISHKUMAR, Kunju et al. Temporal alterations in vascular angiotensin receptors and vasomotor responses in offspring of protein-restricted rat dams. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 206, n. 6, p. 507.e1–10, 2012.

SATOH, H et al. Thiazolidinediones suppress endothelin-1 secretion from bovine vascular endothelial cells: a new possible role of PPARgamma on vascular endothelial function. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 254, n. 3, p. 757–63,

1999.

SCHAIBLE, T F et al. The effects of gonadectomy on left ventricular function and cardiac contractile proteins in male and female rats. **Circulation research**, v. 54, n. 1, p. 38–49, 1984.

SCHMIEDER, R E; MARTUS, P; KLINGBEIL, A. Reversal of left ventricular hypertrophy in essential hypertension. A meta-analysis of randomized double-blind studies. **JAMA**, v. 275, n. 19, p. 1507–13, 1996.

SCHOCK, H W et al. Expression of androgen-binding protein (ABP) in human cardiac myocytes. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme**, v. 38, n. 4, p. 225–9, 2006.

SCHUNKERT H, DANSER AHJ, HENSE H-W, DERKX FHM, KURZINGER S, Riegger GAJ. Effects of estrogen replacement therapy on the renin-angiotensin system in postmenopausal women. **Circulation**, v. 95, p. 39–45, 1997.

SEGA, R et al. Alterations of cardiac structure in patients with isolated office, ambulatory, or home hypertension: Data from the general population (Pressione Arteriose Monitorate E Loro Associazioni [PAMELA] Study). **Circulation**, v. 104, n. 12, p. 1385–92, 2001.

SHAH, M et al. Pathophysiology and clinical spectrum of acute congestive heart failure. **Reviews in cardiovascular medicine**, v. 2 Suppl 2, p. S2-6, 2001.

SHARMA, Ashish Kumar et al. Dual therapy of vildagliptin and telmisartan on diabetic nephropathy in experimentally induced type 2 diabetes mellitus rats. **Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS**, v. 15, n. 4, p. 410–8, 2014.

SICA, Domenic A.; GEHR, Todd W.B. Current Concepts of Pharmacotherapy in Hypertension - ACE Inhibitors: Current Considerations in Their Use. **Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn.)**, v. 1, n. 3, p. 218–230, 1999.

SILVA, Sebastião D. et al. Temporal changes in cardiac oxidative stress, inflammation and remodeling induced by exercise in hypertension: Role for local angiotensin II reduction. **PLOS ONE**, v. 12, n. 12, p. e0189535, 12 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29232407>>. Acesso em: 18 jun. 2019.

SIWIK, D A; PAGANO, P J; COLUCCI, W S. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 280, n. 1, p. C53-60, 2001.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO (SBH). Sociedade Brasileira de Hipertensão (SBH), Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) e Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN). VI Diretrizes brasileiras de hipertensão arterial. **Arq Bras Cardiol**, v. 95(1 Suppl, p. 1–51, 2010.

SORANNO D, PRASAD V, OBERFIELD DR, GRECO A, SIVARAMAN N, Drucker W. Hypertension and virilization caused by a unique dexamethasone and androgen-secreting adrenal adenoma. **J Pediatr Endocrinol Metab**, v. 12, p. 215–220, 1999.

STAMLER, J; STAMLER, R; NEATON, J D. Blood pressure, systolic and diastolic, and cardiovascular risks. US population data. **Archives of internal medicine**, v. 153, n. 5, p. 598–615, 1993.

STARLING, E H; VISSCHER, M B. The regulation of the energy output of the heart. **The Journal of physiology**, v. 62, n. 3, p. 243–61, jan. 1927.

SUGAWARA, A., TAKEUCHI, K., URUNO, A., IKEDA, Y., ARIMA, S., KUDO, M., et al. Transcriptional suppression of type 1 angiotensin II receptor gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in vascular smooth muscle cells. **Endocrinology**, v. 142, p. 3125–3134., 2001.

SULLIVAN, Jennifer C et al. Angiotensin (1-7) receptor antagonism equalizes angiotensin II-induced hypertension in male and female spontaneously hypertensive rats. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 56, n. 4, p. 658–66, 2010.

SWYNGHEDAUW, BERNARD. Molecular Mechanisms of Myocardial Remodeling. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 1, p. 215–262, 1999. Disponível em: <<http://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.1999.79.1.215>>.

TAM, Neville N C et al. Androgenic regulation of oxidative stress in the rat prostate: involvement of NAD(P)H oxidases and antioxidant defense machinery during prostatic involution and regrowth. **The American journal of pathology**, v. 163, n. 6, p. 2513–22, 2003.

TAVARES V, HIRATA RDC, Hirata MH. Ação dos PPARs no metabolismo de lipídeos, homeostase da glicose e inflamação. **Rev Newslab**, v. 57, p. 128–44, 2003.

THIEME, Manuel et al. Phosphodiesterase 5 inhibition ameliorates angiotensin II-dependent hypertension and renal vascular dysfunction. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 312, n. 3, p. F474–F481, 2017.

TODOROV, Vladimir T. et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Is Involved in the Control of Renin Gene Expression. **Hypertension**, v. 50, n. 5, p. 939–944, 2007.

TONTONOZ, Peter; SPIEGELMAN, Bruce M. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. **Annual review of biochemistry**, v. 77, n. 1, p. 289–312, jun. 2008.

TRIPPODO, N C; FROHLICH, E D. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. **Circulation research**, v. 48, n. 3, p. 309–19, 1981.

TSANG, Sharon et al. Testosterone-augmented contractile responses to alpha1- and beta1-adrenoceptor stimulation are associated with increased activities of RyR, SERCA,

and NCX in the heart. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 296, n. 4, p. C766-82, 2009.

USHIO-FUKAI, Masuko et al. p22 phox Is a Critical Component of the Superoxide-generating NADH/NADPH Oxidase System and Regulates Angiotensin II-induced Hypertrophy in Vascular Smooth Muscle Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 38, p. 23317–23321, 1996.

V DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL. V DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL. **Hipertensão, São Paulo**, v. 9, p. 4, 2006.

VALLOTTON MB. The renin-angiotensin system. Trends Pharmacol. **Trends Pharmacol Sci**, v. 8, p. 69–74, 1987.

VASSALLO, D V et al. Effects of isoproterenol on the mechanical activity of isolated papillary muscles and perfused rat hearts in various calcium concentrations. **Pharmacological research**, v. 29, n. 3, p. 251–60, 1994.

_____. Lead reduces tension development and the myosin ATPase activity of the rat right ventricular myocardium. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 41, n. 9, p. 789–95, 2008.

VASSALLO, D V; MILL, J G. Mechanical behavior of rest contractions in cardiac muscle. **Acta physiologica et pharmacologica latinoamericana : organo de la Asociacion Latinoamericana de Ciencias Fisiologicas y de la Asociacion Latinoamericana de Farmacologia**, v. 38, n. 1, p. 87–97, 1988.

VERDECCHIA, Paolo et al. Telmisartan for the reduction of cardiovascular morbidity and mortality. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 4, n. 2, p. 151–161, 2011.

VIDAL-PUIG, A et al. Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. **Journal of Clinical Investigation**, v. 97, n. 11, p. 2553–2561, 1996.

VUTTHASATHIEN, Pavarana; WATTANAPERMPHOL, Jonggonnee. Regular exercise improves cardiac contractile activation by modulating MHC isoforms and SERCA activity in orchidectomized rats. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 119, n. 7, p. 831–9, 2015.

WEBER, K T et al. Fibrillar collagen and remodeling of dilated canine left ventricle. **Circulation**, v. 82, n. 4, p. 1387–401, 1990.

WEBSTER, Keith A. Mitochondrial membrane permeabilization and cell death during myocardial infarction: roles of calcium and reactive oxygen species. **Future Cardiology**, v. 8, n. 6, p. 863–884, 2012.

WHELTON, P K et al. Epidemiology and prevention of blood pressure-related renal disease. **Journal of hypertension. Supplement : official journal of the International Society of Hypertension**, v. 10, n. 7, p. S77-84, 1992.

WHELTON PK. Epidemiology of hypertension. **Lancet**, v. 334, p. 101- 106., 1994.

WIINBERG, N et al. 24-h ambulatory blood pressure in 352 normal Danish subjects, related to age and gender. **American journal of hypertension**, v. 8, n. 10 Pt 1, p. 978–86, 1995.

WITAYAVANITKUL, Namthip et al. Testosterone regulates cardiac contractile activation by modulating SERCA but not NCX activity. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 304, n. 3, p. H465-72, 2013.

WOODIWISS, A J et al. Reduction in myocardial collagen cross-linking parallels left ventricular dilatation in rat models of systolic chamber dysfunction. **Circulation**, v. 103, n. 1, p. 155–60, 2001.

YAMORI Y. Development of the spontaneously hypertensive rat (SHR) and of various spontaneous rat models, and their implications. In: De Jong W (ed.). *Experimental and Genetic Models of Hypertension. Handbook of Hypertension*. Elsevier, p. 224–39, 1984.

YEAP, Bu B. Androgens and cardiovascular disease. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 17, n. 3, p. 269–276, 2010.

YU, S; REDDY, J. Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1771, n. 8, p. 936–951, 2007.

YUE, P et al. Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta. **Circulation**, v. 91, n. 4, p. 1154–60, 15 fev. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7850954>>. Acesso em: 18 jun. 2019.

ZENG, Xiao-Cong; LI, Xing-San; WEN, Hong. Telmisartan protects against microvascular dysfunction during myocardial ischemia/reperfusion injury by activation of peroxisome

proliferator-activated receptor gamma. **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 13, n. 1, p. 39, 2013.

ZHAO, Yu Xia et al. ACE2 overexpression ameliorates left ventricular remodeling and dysfunction in a rat model of myocardial infarction. **Human gene therapy**, v. 21, n. 11, p. 1545–54, 2010.