

**Influência dos hormônios sexuais masculinos
sobre a reatividade vascular de artérias
mesentéricas de terceira ordem: uma avaliação
temporal**

Wender do Nascimento Rouver

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas

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

Vitória, junho de 2020

WENDER DO NASCIMENTO ROUVER

**Influência dos hormônios sexuais masculinos
sobre a reatividade vascular de artérias
mesentéricas de terceira ordem: uma avaliação
temporal**

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

Orientador: Prof. Dr. Roger Lyrio dos Santos

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

Vitória, junho de 2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

REGISTRO DE JULGAMENTO DA TESE DO CANDIDATO AO GRAU DE DOUTOR PELO PPGCF CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS.

A Comissão Examinadora da Tese de Doutorado intitulada “INFLUÊNCIA DOS HORMÔNIOS SEXUAIS MASCULINOS SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR DE ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE TERCEIRA ORDEM: UMA AVALIAÇÃO TEMPORAL” elaborada por WENDER DO NASCIMENTO ROUVER, candidato ao Grau de Doutor em Ciências Fisiológicas, recomendou, após apresentação da Tese, realizada no dia 30 de junho de 2020, que a mesma seja (assinale um dos itens abaixo):

(X) Aprovada

() Reprovada

Vitória, 30 de junho de 2020.

Prof. Dr. Roger Lyrio dos Santos
(PPGCF-UFES) – Orientador

Prof. Dr. Jones Bernardes Graceli
(PPGCF-UFES) – Titular interno

Prof. Dr. Jones B. Graceli
Depto. Morfologia - CCS-UFES
Matrícula: SIAPE: 26302980

Profª. Drª. Nazaré Souza Bissoli
(PPGCF-UFES) – Titular interno

Profª. Drª. Virgínia Soares Lemos
(UFMG) – Titular externo

Prof. Dr. Hélder Mauad
(UFES) - Titular externo

Prof. Dr. Hélder Mauad
Professor Titular do Dept. de
Ciências Fisiológicas
CCS UFES
Mat.: 1173222





UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
ROGER LYRIO DOS SANTOS - SIAPE 2531318
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS
Em 08/07/2020 às 16:58

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/37845?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
JONES BERNARDES GRACELI - SIAPE 2630280
Departamento de Morfologia - DM/CCS
Em 13/07/2020 às 07:34

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/38931?tipoArquivo=O>

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Vitória, junho de 2020

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

R852i Rouver, Wender do Nascimento, 1979-
Influência dos hormônios sexuais masculinos sobre a reatividade vascular de artérias mesentéricas de terceira ordem: uma avaliação temporal / Wender do Nascimento Rouver. - 2020. 126 f. : il.

Orientador: Roger Lyrio dos Santos.
Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Hormônios sexuais. 2. Testosterona. 3. Artéria mesentérica. 4. Músculo liso vascular. 5. Endotélio. 6. Idade.
I. Santos, Roger Lyrio dos. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 612

DEDICATÓRIA

À minha família.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela graça de ter completado essa jornada! Por seus ensinamentos serem lâmpadas para os meus pés, e luz para os meus caminhos!

Aos meus pais, Luzia Almeida do Nascimento e José Carlos Rouver. À Manoel Ribeiro da Paz. Nos momentos mais difíceis, daqui vinham o suporte, o carinho e aconchego necessários. Muito obrigado!

Aos meus irmãos Emerson do Nascimento Rouver e Anderson do Nascimento Rouver pelo companheirismo e suporte. Muito obrigado por sempre estarem disponíveis!

À Jéssyca Aparecida Soares Giesen, minha namorada, amiga e companheira de todas as horas. Sou grato por todo seu apoio, empenho e dedicação na execução desse trabalho. Sua ajuda foi fundamental para a concretização deste projeto. Obrigado pelas noites de sono perdidas, pelos *insights* e por sempre estar do meu lado. Muito obrigado!

Aos “Charlies” André Luiz, Ana Claudia, Joelson Cruz, Juliana Pinto, Luiz Claudio, Polyana Monteiro, Cristiane Nagasse, Luana Nascimento, Rafael Duarte, Wanderson Monteiro, Rômulo Possatto e Amanda Roncetti, pela amizade que faz com que as dificuldades da vida sejam aliviadas pelos momentos de alegrias. Obrigado a todos!

À Comunidade Católica São João Batista de Barcelona, Serra e Santa Cecília de Santa Cecília, Cariacica, pelas orações! Também agradeço ao Coro *Sacrorum Cordium* na pessoa do Maestro Jailson Moura, por nos ajudar a elevar a Deus orações com métricas e técnicas musicais.

Aos meus amigos do Laboratório de Estudos em Reatividade Vascular – LABERV: Jéssyca Giesen (aqui também), Nathalie Tristão, Letícia Tinoco, Tagana Rosa, Débora Tacon, Juan Arapa-Diaz, Izabela Bonfim, Menara Martins, Matheus Zucolotto, Jocimar Pitol, Ana Dária, Lara Amaro, Lucas Sales, Tiago da Silva,

Patrícia Benevides, Sunamita, Priscila Cruz e Emilly Vila Real. A todos, meu muito obrigado!

A todos os demais colegas do PPGCF,

De forma especial agradeço ao amigo, compadre, professor e orientador Dr Roger Lyrio dos Santos. pela confiança e credibilidade cedidas a mim. Agradeço pelos aconselhamentos e por sempre se colocar à disposição para ajudar. Muito obrigado!

“Uma vez orientadora, sempre orientadora” – À professora Margareth Ribeiro Moyses.

Aos professores Nazaré Souza Bissoli, Jones Bernardes Graceli, Leonardo dos Santos, Carmem Luiza Sartório, por toda ajuda durante meu doutoramento. Estendo meus agradecimentos a todos os professores do PPGCF. Agradeço também a todos os profissionais técnicos, em especial, Anderson Almeida, Cíntia Silva Lirio, Enildo Broetto Pimentel, Rodolpho José da Silva Barros, Cynara Oliveira Possamai e Rodrigo Coffler Batista, pelo suporte na demanda do dia-a-dia do PPGCF. Agradeço ainda aos Doutores Erick Roberto Gonçalves Claudio e Fabrício Bragança da Silva pela parceria, amizade e companheirismo.

A parceria com a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) na pessoa da professora Dr^a Virgínia Soares Lemos e do Dr Eduardo Damasceno Costa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo – FAPES e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas – PPGCF, pelo fomento científico oriundo de recursos públicos cobrados sob a forma de tributos ao povo brasileiro.

A todos meu muito obrigado!

“Nenhum atleta será coroado, se não tiver lutado segundo as regras. É preciso que o lavrador trabalhe antes com afinco, se quer boa colheita. Entende bem o que eu quero dizer. O Senhor há de dar-te inteligência em tudo”.

Paulo de Tarso

SUMÁRIO

RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
LISTA DE FIGURAS	xvi
LISTA DE TABELAS	xxi
LISTA DE ABREVIATURAS	xxii
1. INTRODUÇÃO	26
2. OBJETIVOS	45
2.1 OBJETIVO GERAL	45
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
3. MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	47
3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	47
3.2.1 Orquiectomia	47
3.2.2 Reatividade Vascular	48
3.2.3 Histomorfometria	51
3.2.4 Análise da densidade de colágeno	52
3.2.5 Microscopia eletrônica de varredura	52
3.2.6 Avaliação dos níveis de NO, O₂^{•-} e H₂O₂	52
3.2.7 Avaliação da pressão arterial	53
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
4. RESULTADOS	57
4.1 DADOS PONDERAIS	57
4.2 REATIVIDADE VASCULAR	57
4.3. ANÁLISE MORFOLÓGICA	64
4.4. ANÁLISE DOS NÍVEIS DE FLUORESCÊNCIA DO NO, O ₂ ^{•-} E H ₂ O ₂	68

4.5. AVALIAÇÃO PRESSÃO ARTERIAL	70
5. DISCUSSÃO	73
6. CONCLUSÃO	84
7. REFERÊNCIAS.....	86
APÊNDICES	114

RESUMO

Os hormônios sexuais masculinos têm sido associados com risco de doenças cardiovasculares, porém essa relação não está completamente esclarecida. Estudos que buscam elucidar o papel dos andrógenos sobre reatividade vascular têm apontado divergências, principalmente acerca da participação desses hormônios relacionados a idade. Nossa hipótese é que a presença dos hormônios sexuais masculinos, no decorrer da idade, seja capaz de prejudicar a reatividade vascular. Diante disso, o objetivo deste estudo foi fazer uma avaliação temporal da reatividade vascular de artérias mesentéricas de terceira ordem, a fim de esclarecer a participação dos andrógenos na função vascular em ratos. Para esse estudo foram utilizados ratos Wistar e os protocolos realizados foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA – UFES, número 07/2016). Animais com oito semanas de idade foram divididos em Sham e orquiectomizados (ORX), e foram avaliados 15, 30, 60 e 75 dias pós cirurgia. A reatividade vascular foi avaliada em artérias mesentéricas de terceira ordem. Para tanto, foram construídas curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh, 0,1 nM – 10 uM) em artérias previamente contraídas com fenilefrina (PE, 3 uM), antes e após o uso de inibidores da óxido nítrico sintase (NOS) (N^{ω} -nitro-L-arginine methyl ester – L-NAME 300 uM) ou ciclooxigenase (COX) (indometacina – INDO 10 uM), de modo individual ou combinada. Também foram realizadas curvas concentração-resposta à PE (1nM - 100µM). As dosagens de óxido nítrico (NO), ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram realizadas no tecido vascular por meio da marcação fluorescente com *4,5-diaminofluorescein diacetate* (DAF-2DA), *2', 7' dichlorodihydrofluorescein diacetate* (H2DCF-DA) e *dihydroethidium* (DHE), respectivamente. As Análises histomorfométricas foram realizadas por marcação com Hematoxilina-Eosina e microscopia eletrônica de varredura nas artérias estudadas. Os parâmetros pressóricos foram avaliados por meio de medidas indireta (pletismografia de cauda) e direta (canulação da artéria femoral) da pressão arterial nas artérias estudadas. O grupo Sham-75d apresentou prejuízo no relaxamento dependente do endotélio comparado com os outros grupos Sham e ORX. Todos os grupos estudados apresentaram uma resposta vasodilatadora

independente da via dos prostanoídes e dependente da via do NO, porém essa dependência parece ser menor no grupo Sham-75d. O grupo Sham-75d apresentou menor produção de NO e H₂O₂ e maior produção de O^{2•-}. Embora os animais Sham-75d tenham apresentado diferenças morfológicas e funcionais nas artérias mesentéricas de terceira ordem em relação aos demais animais, não foi observado alteração na pressão arterial entre os grupos ao longo do tempo de observação. Nossos dados mostram que os hormônios sexuais masculinos parecem exercer um importante papel no desenvolvimento de alterações vasculares que pode levar a prejuízos na reatividade vascular de artérias mesentéricas o que poderia se relacionar com início das alterações cardiovasculares referente ao fator idade no sexo masculino.

Palavras chave: Andrógenos, reatividade vascular, artéria mesentérica de terceira ordem, endotélio, avaliação temporal

ABSTRACT

Male sex hormones have been associated with a risk of cardiovascular disease, but this relationship is not fully understood. Studies that aim to elucidate the role of androgens on vascular reactivity have pointed out divergences, mainly regarding the participation of these hormones related to age. Our hypothesis is that the presence of male sex hormones, over the age, is able to impair the vascular reactivity. Therefore, the objective of this study was to make a temporal assessment of the vascular reactivity of third-order mesenteric arteries, in order to clarify the participation of androgens in the vascular function in rats. In this study Wistar rats were used and the protocols performed were previously approved by the *Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA - UFES, number 07/2016)*. Eight-week-old animals were divided into Sham and orchietomized (ORX), and were evaluated 15, 30, 60 and 75 days after surgery. Vascular reactivity was assessed in third-order mesenteric arteries. For this purpose, concentration-response curve to acetylcholine (ACh, 0.1 nM - 10 μ M) it were constructed in arteries previously contracted with phenylephrine (PE, 3 μ M), before and after the use of nitric oxide synthase (NOS) (N ω -nitro-L-arginine methyl ester - L-NAME 300 μ M) or cyclooxygenase (COX) (indomethacin - INDO 10 μ M), inhibitors individually or in combination. PE concentration-response curve (1nM - 100 μ M) was also performed. Nitric oxide (NO), superoxide anion (O $^{2\bullet-}$) and hydrogen peroxide (H $_2$ O $_2$) dosages were performed on vascular tissue using fluorescent labeling with 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2DA), 2', 7' dichlorodihydrofluorescein diacetate (H $_2$ DCF-DA) and dihydroethidium (DHE), respectively. Histomorphometric analysis were performed by staining with Hematoxylin-Eosin and scanning electron microscopy in the studied arteries. Blood pressure parameters were assessed by indirect (tail plethysmography) and direct (femoral artery cannulation) measurements. The Sham-75d group showed impairment in endothelium-dependent relaxation compared to the other Sham and ORX groups. All groups studied showed a prostanoid-independent and a NO-dependent vasodilatory pathway response, however this NO dependence seems to be less in the Sham-75d group. The Sham-75d group had a lower NO, and H $_2$ O $_2$ production and a higher O $^{2\bullet-}$ production. Although Sham-75d animals showed

morphological and functional differences in the third-order mesenteric arteries in comparison to the other animals, there was no change in blood pressure among the studied groups over the observation period. Our data show that male sex hormones appear to play an important role in the development of vascular changes that can lead to impaired vascular reactivity in mesenteric arteries, which could be related to the onset of cardiovascular changes related to the age in males.

Keywords: Androgens, vascular reactivity, third-order mesenteric artery, endothelium, temporal evaluation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação esquemática.** Biossíntese e metabolismo dos hormônios esteroides. Fonte: MILLER; AUCHUS (2011)..... 31
- Figura 2 – Representação esquemática.** Mecanismos de ação genômica dos andrógenos. Fonte: BENNETT et al. (2010)..... 35
- Figura 3 – Representação esquemática.** Mecanismos de ação não-genômica dos andrógenos nas células vasculares. a: mecanismo dependente do endotélio, possivelmente envolvendo fatores de relaxamento derivados do endotélio (principalmente o óxido nítrico - NO), que parece estar envolvido no relaxamento vascular. O aumento do cGMP promovido pelo NO induz ao relaxamento da musculatura lisa vascular. b: Em condições fisiológicas, andrógenos podem agir diretamente como antagonistas de canais para Ca^{2+} promovendo relaxamento vascular pela diminuição do influxo de Ca^{2+} . c: Andrógenos, em concentrações suprafisiológicas podem aumentar a probabilidade de abertura de canais para Ca^{2+} aumentando a concentração intracelular de Ca^{2+} induzindo a vasoconstrição. d: Andrógenos podem estimular a probabilidade de abertura de canais para potássio, hiperpolarizando as células do músculo liso vascular e posterior relaxamento. e: Andrógenos são capazes de aumentar a produção de cGMP e cAMP. Modificado de PERUSQUÍA; STALLONE, 2010..... 37
- Figura 4 - Esquema representativo das etapas da orquiectomia.** (A) preparação do campo operatório, (B) incisão na linha média da bolsa testicular, (C) exposição do testículo, (D) ligadura em torno do cordão espermático. (E) remoção do testículo e (F) sutura da bolsa testicular. 48
- Figura 5 - Esquema representativo da fixação do segmento arterial com 2 mm de comprimento no miógrafo de resistência.** (A) fixação do primeiro fio de tungstênio, acoplado a uma haste fixa e (B) fixação do segundo fio, acoplado a uma haste móvel conectada a um transdutor de força isométrica. 50

Figura 6 - Esquema representativo do processo de normalização. (A) Ilustração do procedimento de normalização gradual e (B) ilustração do ajuste da curva para determinação do IC100. Adaptado do manual de utilização: Wire Myograph System - 620m - user guide. 50

Figura 7 - Fluxograma. Representação esquemática dos protocolos de reatividade vascular. 51

Figura 8 - Reatividade vascular à acetilcolina (ACh, 10^{-10} M - 10^{-5} M) em artéria mesentérica de terceira ordem de ratos Wistar Sham e orquiectomizados (ORX). (A e D) curva concentração-resposta à ACh, (B e E) área abaixo da curva e (C e F) resposta máxima de relaxamento dos grupos Sham e ORX após 15, 30, 60 e 75 dias de cirurgia. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (two-way ANOVA) seguida pelo Bonferroni post hoc test. * $p < 0,05$ comparado com grupo Sham-15d, # $p < 0,05$ comparado com Sham-30d e + $p < 0,05$ comparado Sham-60d. n=7 para cada grupo. 59

Figura 9 - Participação dos mediadores endoteliais na curva concentração-resposta à acetilcolina (ACh, 10^{-10} M - 10^{-5} M) em artéria mesentérica de terceira ordem de ratos Sham após 15 e 75 dias de cirurgia. (A e D) Efeito da inibição da ciclooxigenase (COX) com indometacina (INDO, 10 μ M), n=7 para grupo 15d e n=6 para grupo 75d, (B e E) inibição da óxido nítrico sintase (NOS) com N^w-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 300 μ M), n=7 para grupo 15d e n=6 para grupo 75d, (C e F) inibição combinada da NOS e COX com L-NAME + INDO, n=7 para grupo 15d e n=6 para grupo 75d e (G) contribuição dos prostanoides (PNs), óxido nítrico (NO) e PNs + NO. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (two-way ANOVA) seguida pelo Bonferroni post hoc test. * $p < 0,05$ comparado com seu respectivo grupo Sham. 61

Figura 10 - Participação dos mediadores endoteliais na curva concentração-resposta à acetilcolina (ACh, 10^{-10} M - 10^{-5} M) em artéria mesentérica de terceira

ordem de ratos orquiectomizados (ORX) após 15 e 75 dias de cirurgia. (A e D) Efeito da inibição da ciclooxigenase (COX) com indometacina (INDO, 10 μ M), n=8 para cada grupo, (B e E) efeito da inibição da óxido nítrico sintase (NOS) com N^w-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 300 μ M), n=7 para grupo 15d e n=8 para grupo 75d, (C e F) inibição combinada da NOS e COX com L-NAME + INDO, n=8 para grupo 15d e n=7 para grupo 75d e (G) contribuição dos prostanoídes (PNs), óxido nítrico (NO) e PNs + NO. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (two-way ANOVA) seguida pelo Bonferroni post hoc test. *p<0,05 comparado com seu respectivo grupo ORX..... 62

Figura 11 - Reatividade vascular à fenilefrina (PE, 10⁻⁹ M - 10⁻⁴ M) em artéria mesentérica de terceira ordem de ratos Wistar Sham e orquiectomizados (ORX). (A e D) curva concentração-resposta à PE, (B e E) área abaixo da curva e (C e F) resposta máxima de contração dos grupos Sham (n=6 para cada grupo) e ORX (n=6-7 para cada grupo) após 15, 30, 60 e 75 dias de cirurgia. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (two-way ANOVA) seguida pelo Bonferroni post hoc test. *p<0,05 comparado com grupo Sham-15d, #p<0,05 comparado com Sham-30d e +p<0,05 comparado Sham-60d. 64

Figura 12 - Imagem histomorfométrica de coloração por Hematoxilina-Eosina (H&E) ou por Picrosirius red em artéria mesentérica de terceira ordem de ratos Sham pós 15 e 75 dias de cirurgia. Camadas média (M), adventícia (A) e lúmen (L) em: (A e A1) secções histológicas de artéria mesentérica de terceira ordem do grupo Sham-15d mostrando aparente morfologia normal do vaso e (B e B1) Secções histológicas de artéria mesentérica de terceira ordem do grupo Sham-75d com aparente sinais de atrofia da musculatura lisa vascular. Imagem representativa da densidade de colágeno no grupo (C) Sham-15d e (D) Sham-75d. Área do lúmen vascular (E), espessura de parede da musculatura lisas vascular (F) e densidade de colágeno (G) nos grupos Sham-15 e 75d. Barra de escala = 50 μ m e 20 μ m. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise

estatística foi realizada por meio do teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$ comparado com grupo Sham-15d. $n=4$ para cada grupo. $n=4$ para cada grupo..... 67

Figura 13 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando a superfície endotelial de artérias mesentéricas de terceira ordem de ratos Sham após 15 e 75 dias de cirurgia. (A e A1) Células endoteliais das artérias mesentéricas de terceira ordem do grupo Sham-15d de aparência escamosa normal mostrando aparência regular da célula epitelial nucleada (seta). (B e B1) Superfície endotelial das artérias mesentéricas de terceira ordem do grupo Sham-75d com superfície irregular, sugerindo dano superficial das células endoteliais com acúmulo de células sanguíneas e aspecto contraído (asterisco). Barra de escala = 5 μm e 2 μm . $n=4$ para cada grupo. 67

Figura 14 - Análise da microscopia de fluorescência emitida pelo DAF-2DA em artérias mesentéricas de terceira ordem de ratos Wistar Sham após 15 e 75 dias de cirurgia. Os protocolos foram realizados na ausência ou na presença de inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (L-NAME, 300 μM) com quantificação da fluorescência produzida. Barra de escala = 20 μm . Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (two-way ANOVA) seguida pelo Tukey's post hoc test. * $p < 0,05$ comparado com mesmo grupo sob condições basais e # $p < 0,05$ comparado com seu respectivo grupo 15d. $n=4$ para cada grupo..... 68

Figura 15 - Análise da microscopia de fluorescência emitida pelo DHE em artérias mesentéricas de terceira ordem de ratos Wistar Sham após 15 e 75 dias de cirurgia. Os protocolos foram realizados na ausência ou na presença de scavenger (varredor/eliminador) de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Tiron, 10 μM) com quantificação da fluorescência produzida. Barra de escala = 20 μm . Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (two-way ANOVA) seguida pelo Tukey's post hoc test. * $p < 0,05$ comparado com mesmo grupo sob condições basais e # $p < 0,05$ comparado com seu respectivo grupo 15d. $n=4$ para cada grupo..... 69

Figura 16 - Análise da microscopia de fluorescência emitida pelo H2DCF-DA em artérias mesentéricas de terceira ordem de ratos Wistar Sham após 15 e 75 dias de cirurgia. Os protocolos foram realizados na ausência ou na presença de catalase (1000 units / mL), enzima que degrada H₂O₂ com quantificação da fluorescência produzida. Barra de escala = 20 µm. Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (two-way ANOVA) seguida pelo Tukey's post hoc test. *p<0,05 comparado com mesmo grupo sob condições basais e #p<0,05 comparado com seu respectivo grupo 15d. n=4 para cada grupo..... 69

Figura 17 - Avaliação não invasiva da pressão arterial sistólica (PAS) por meio de pletismografia de cauda. PAS de ratos Sham (n=7) e orquiectomizados (ORX, n=10) ao longo de 10 semanas de observação. Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (two-way ANOVA) seguida pelo Bonferroni post hoc test..... 70

Figura 18 - Avaliação invasiva da pressão arterial por meio da cateterização da artéria femoral. (A) Pressão arterial sistólica, (B) pressão arterial diastólica (B), (C) pressão arterial média e (D) frequência cardíaca de ratos Sham e orquiectomizados (ORX) após 75 dias de cirurgia. Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada por meio do Student's t tests. N=9 para cada grupo. 71

Figura 19 - Representação esquemática. Resumo gráfico dos principais achados do presente estudo. Os animais Sham-75d apresentaram prejuízo no relaxamento vascular e maior atividade contrátil nas artérias mesentéricas de terceira ordem comparado aos animais Sham-15d. Os animais Sham-75d apresentaram também maior fluorescência ao O₂^{•-} e menor fluorescência tanto ao NO quanto H₂O₂..... 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados ponderais de ratos Wistar dos grupos Sham e orquiectomizados (ORX) pós 15, 30, 60, e 75 de cirurgia.....	58
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh: Acetilcolina

ANOVA: Análise de variância

AR: Receptor de andrógeno

AUC: Área abaixo da curva (*Area Under Curve*)

BH₄: (6R)- 5, 6, 7, 8 – tetrahydro-L-biopterina

Ca²⁺ (Ca⁺⁺): Íon cálcio

cAMP: 3', 5'-adenosina monofosfato cíclico

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CAT: Catalase

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

cGMP: 3' 5' – guanosina monofosfato cíclico

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CO₂: Dióxido de carbono

COX: Ciclooxygenase

DAF-2: Diacetato de 4,5-diaminofluoresceína

DHE: Dihidroetídeo

DHEA: Desidroepiandrosterona

DHT: Diidrotestosterona

DNA: ácido desoxirribonucleico

ECA: Enzima conversora de angiotensina

EDH: Hiperpolarização dependente do endotélio

eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial

EPM: Erro padrão da média

FAPES: Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo

GP_{ER}: Receptor de estrogênio acoplado a proteína G

GPRC6A: Membro A do grupo 6 da família C do receptor acoplado à proteína G

GPx: Glutathione peroxidase

H2DCF-DA: Diacetato de 2', 7' diclorodihidrofluoresceína

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

INDO: Indometacina

K⁺: Íon potássio

L-NAME: N^ω-nitro-L-arginina metil éster

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintase

O₂: Oxigênio

O₂^{•-}: Ânion superóxido

ONOO⁻: Peroxinitrito

ORX: Orquiectomizado

PAD: Pressão arterial diastólica

PAM: pressão arterial média

PAS: Pressão arterial sistólica

PBS: Tampão fosfato salina

PE: Fenilefrina -

PKA: Proteína cinase dependente de AMP

PNs: Protanoides

PPGCF: Programa de Pós-graduação em ciências Fisiológicas

SHBG: Globulina de ligação ao hormônio sexual (*sex hormone binding globulin*)

SOD: Superóxido dismutase

TRPM8: Canais de potencial transiente de receptor 8 da subfamília M
(melastatina)

u.a: Unidades arbitrárias

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇAS CARDIOVASCULARES E ANDRÓGENOS

As doenças cardiovasculares lideram como principal causadora de morte no mundo. Estimativas apontam que em 2015, aproximadamente 17,9 milhões das pessoas acometidas por doenças cardiovasculares evoluíram a óbito, o que corresponde a aproximadamente 31 % de todas as mortes registradas (WANG *et al.*, 2016; KISHORE *et al.*, 2018). Um estudo sobre a epidemiologia das doenças cardiovasculares em países que falam português, apontou que, no Brasil, no período de 1990 a 2016 a taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares chegou a 30 % (NASCIMENTO *et al.*, 2018). Esses dados se relacionam ao aumento da população idosa, bem como inadequada qualidade de vida da população, com por exemplo: sedentarismo, obesidade e estresse, fatores que levam ao aumento da mortalidade por doenças cardiovasculares (PRÉCOMA *et al.*, 2019).

É conhecido que os homens são mais susceptíveis ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares quando comparados às mulheres na pré-menopausa (BENJAMIN *et al.*, 2018), atribuindo-se assim aos hormônios sexuais femininos, um papel protetor sobre sistema cardiovascular (FARHAT; LAVIGNE; RAMWELL, 1996; MOSCA *et al.*, 2007; MILLER; MITCHELL HARMAN, 2017). O sexo masculino, por sua vez, é apontado como fator de risco cardiovascular (MALACHIAS *et al.*, 2016; PRÉCOMA *et al.*, 2019), embora o papel dos hormônios sexuais masculinos sobre esse sistema ainda seja controverso (PANTALONE *et al.*, 2019). Desta forma, as diferenças promovidas pelos hormônios sexuais masculinos parecem desempenhar um papel fundamental na modulação do sistema cardiovascular, conduzindo a um maior risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (MCCULLOCH; RANDALL, 1998; ROSANO; SPOLETINI; VITALE, 2017).

1.2. PAPEL CONTROVERSO DOS ANDRÓGENOS

O risco de eventos cardiovasculares adversos, bem como de mortalidade associados a terapia de reposição com andrógenos, é controverso (PANTALONE *et al.*, 2019). Estudos que tiveram como objetivo investigar o papel dos andrógenos nos sistemas vasculares demonstraram que a ação desses hormônios ainda não foi completamente esclarecida (HERMAN *et al.*, 1997; PERUSQUÍA; STALLONE, 2010; TOSTES *et al.*, 2016). Por exemplo, nos anos 90, foi sugerido que níveis reduzidos de testosterona se associaram a melhora da função endotelial em homens adultos (HERMAN *et al.*, 1997). Além disso, em diferentes modelos animais, os hormônios sexuais masculinos apresentaram efeitos deletérios na parede arterial tanto de fêmeas (ADAMS; WILLIAMS; KAPLAN, 1995; MCCREDIE *et al.*, 1998; TEOH *et al.*, 2000; COSTA *et al.*, 2015), quanto de machos (SCHRÖR *et al.*, 1994; TEOH *et al.*, 2000). Contudo, já na década de 2000, um outro ponto de vista sobre a ação vascular dos andrógenos foi apresentado à comunidade científica. Ou seja, estudos realizados com o intuito de avaliar os efeitos da testosterona demonstraram ações benéficas sobre o sistema vascular (WU; VON ECKARDSTEIN, 2003; TRAISH; GALOOSIAN, 2013; TRAISH, 2014). Com esse cenário, ficou evidente o papel controverso dos hormônios sexuais masculinos sobre o ambiente vascular e que o conhecimento sobre suas ações dependia de estudos adicionais (PERUSQUÍA; STALLONE, 2010; LOPEZ; CANFIELD; WANG, 2016; LOO *et al.*, 2017).

1.3. ANDRÓGENOS, UMA ABORDAGEM HISTÓRICA

Os efeitos dos hormônios testiculares são conhecidos desde a antiguidade, bem como as alterações físicas e comportamentais advindas da diminuição na produção dos andrógenos, hormônios esteroides responsáveis por conferir características masculinas (NIESCHLAG; NIESCHLAG, 2014, 2019). Uma abordagem histórica aponta que a mutilação do órgão sexual masculinos atendeu a diversos propósitos. Dentre esses, manter escravos leais e obedientes, como forma de punição por delitos, bem como era conhecido que a castração na idade pré-púbere era capaz

de promover, em meninos, vozes altas (soprano) resultando em cantores de ópera que se apresentavam em óperas nos séculos XVII e XVIII (NIESCHLAG; NIESCHLAG, 2019). A castração também era realizada por recomendação para tratamento de diversas doenças durante a idade média (até século XV) (MELICOW, 1977). Contudo, na tentativa de observar possíveis alterações vindas das secreções testiculares constam os transplantes, realizados por John Hunter, inserindo testículos de galos na cavidade peritoneal de galinhas em meados do século XVIII (SETCHELL, 1990).

As primeiras descrições acerca de que substâncias produzidas pelos testículos pudessem modular a atividade de células distantes, bem como promover alterações de comportamento datam de 1849 por Arnold Adolph Berthold (1803-1861). Em seu artigo (*Über die Transplantation der Hoden*) (BERTHOLD, 1849), Arnold Adolph Berthold, um fisiologista alemão, demonstrou que o transplante de testículos entre indivíduos da mesma espécie (experimento realizado em galos) foi capaz de influenciar o desenvolvimento de todo organismo, dando assim grande contribuição no campo da endocrinologia, sendo o primeiro a postular o efeito endócrino do testículo (BARTEN; NEWLING, 1996). Frente a essas descobertas, a comunidade médica passou a realizar implantes humanos de testículos retirados de vítimas de acidentes, condenados executados, bem como de carneiros jovens (LYDSTON, 1916; STANLEY, 1920).

O auge da utilização de testículos em transplantes ou até mesmo para consumo (conhecido por organoterapia) só ocorreu no final do século XIX com as descrições do fisiologista e neurologista Charles-Édouard Brown-Séquard e seus colaboradores. Após autoaplicação, via injeções subcutâneas, de um extrato testicular (sangue das veias testiculares, sêmen e extrato de testículos de cães ou cobaias), Brown-Séquard (aos 72 anos), relatou melhora considerável na sua saúde (BROWN-SÉQUARD *et al.*, 1889). Embora tenha sido efeito placebo (CUSSONS *et al.*, 2002), esse procedimento começou a ser conhecido pela população e comercializado pelo mundo ocidental (BORELL, 1976).

O isolamento do primeiro andrógeno, porém, só ocorreu em 1931, pelo químico alemão Adolf Butenandt utilizando urina de jovens policiais, de onde conseguiu isolar a androsterona, (BUTENANDT, 1931). Contudo, um andrógeno mais ativo, comparado a androsterona, extraído do testículo de touro, foi isolado em 1935 por um grupo de pesquisa coordenado pelo médico e farmacologista Ernst Laqueur e a esse novo andrógeno foi dado nome de testosterona (testo = testículo, ster = esterol e ona = cetona) (DAVID *et al.*, 1935). Ainda em 1935, a síntese química da testosterona foi publicada por dois diferentes grupos de pesquisa, liderados por Adolf Butenandt (BUTENANDT; HANISCH, 1935) e Leopold Ruzicka (RUZICKA; WETTSTEIN, 1935). Em 1939 esses dois pesquisadores receberam o Prêmio Nobel de Química pelos seus trabalhos acerca dos hormônios esteroides, contudo Butenandt teve que recusar a premiação, forçado pelo governo nazista (OETTEL, 2004), recebendo assim a medalha e o diploma da premiação mais de 10 anos depois, em 1949 (NIESCHLAG; NIESCHLAG, 2019).

Todos esses estudos foram um marco do início da farmacologia clínica, bem como da bioquímica moderna, acerca dos hormônios sexuais e da fisiologia reprodutiva masculina (NIESCHLAG; NIESCHLAG, 2014, 2019; TYAGI *et al.*, 2017; MORGENTALER; TRASH, 2018). Outro marco importante foi a descrição da aromatização, processo de conversão da testosterona em estrogênio, descrita ainda na década de 30 (STEINACH; KUN, 1937). Contudo, diante da evolução acerca do conhecimento bioquímico dos hormônios androgênicos, curiosamente, somente em 1968, mais de 30 anos depois, foi publicado o primeiro artigo descrevendo a conversão de testosterona em seu metabólito 5 α -dihidrotestosterona (DHT), considerado mais ativo (BRUCHOVSKY; WILSON, 1968), bem como o avanço do conhecimento da biossíntese dos hormônios esteroides e na compreensão bioquímica das várias enzimas e cofatores esteroidogênicos (MILLER; AUCHUS, 2011).

1.4. BIOSÍNTESE DOS ANDRÓGENOS - ESTEROIDOGÊNESE

A testosterona é um importante hormônio esteroide masculino da família dos andrógenos. Aproximadamente 95 % da testosterona endógena é produzida e secretada pelas células de Leydig testiculares (WEN; CHENG; LIU, 2016). Pequenas quantidades de testosterona também são secretadas pela zona reticular das glândulas suprarrenais (SÁ *et al.*, 2009). Os níveis plasmáticos de testosterona em homens variam entre 10 e 30 nM, com níveis mais baixos encontrados em mulheres (entre 0,6 e 2,5 nM) (BURGER, 2002).

A via clássica de biossíntese dos andrógenos acontece nas células de Leydig (WEN; CHENG; LIU, 2016). Esta é uma célula testicular altamente especializada para a produção de andrógenos e expressa todos os genes necessários que são comuns aos órgãos produtores de andrógenos (MILLER; AUCHUS, 2011). Após estimulação pelo hormônio luteinizante, produzido pela hipófise anterior, em seu receptor específico localizado na membrana das células de Leydig (DUFAU, 1998), há um aumento da produção de andrógenos (DUFAU, 1988). Os andrógenos, dentre eles a testosterona, tem o colesterol como seu precursor e são sintetizados por meio de uma série de reações enzimáticas que ocorrem no interior das mitocôndrias (WINTERS; TAKAHASHI; TROEN, 1999). Inicialmente, as moléculas de colesterol são transportadas para a mitocôndria (membrana interna) por meio da proteína reguladora aguda esteroidogênica (StAR) (CLARK; STOCCO, 1996). Na membrana mitocondrial interna o sistema de clivagem da cadeia lateral composto pela enzima CYP11A1 (P450_{scc}), colesterol desmolase, converte o colesterol em pregnenolona (CLARK; STOCCO, 1996). Uma vez formada, a pregnenolona é transferida para o retículo endoplasmático, onde é convertida em testosterona por meio de uma série de reações enzimáticas e tem como precursores a progesterona, 17 α -hidroxiprogesterona e posteriormente androstenediona (via denominada Δ 4) ou a pregnenolona, 17 α -hidroxipregnenolona e subsequente formação de desidroepiandrosterona (DHEA) (via denominada Δ 5) (WINTERS; TAKAHASHI; TROEN, 1999; MARCELLI, 2017). A figura 1 resume as etapas da esteroidogênese que ocorre nas gônadas masculinas. Depois de sintetizada, aproximadamente de 7 a 10 % da testosterona pode ser convertida em um metabólito, diidrotestosterona

(DHT) via 5α ou β -redutase (BRUCHOVSKY; WILSON, 1968, 1999; PERUSQUÍA; STALLONE, 2010) e pequenas quantidades (aproximadamente 0,5 %) em estrogênio via enzima CYP19A1 (P450 - aromatase) (CLARK; STOCCO, 1996; OETTEL, 2002; PERUSQUÍA; STALLONE, 2010; MARCELLI, 2017; SCHIFFER; ARLT; STORBECK, 2018). De forma geral, a conversão da testosterona em seu metabólito DHT eleva, em cerca de 10 a 15 vezes, a afinidade do andrógeno pelo seu receptor (ASKEW *et al.*, 2007; LOPES *et al.*, 2012; FLÜCK; PANDEY, 2014).

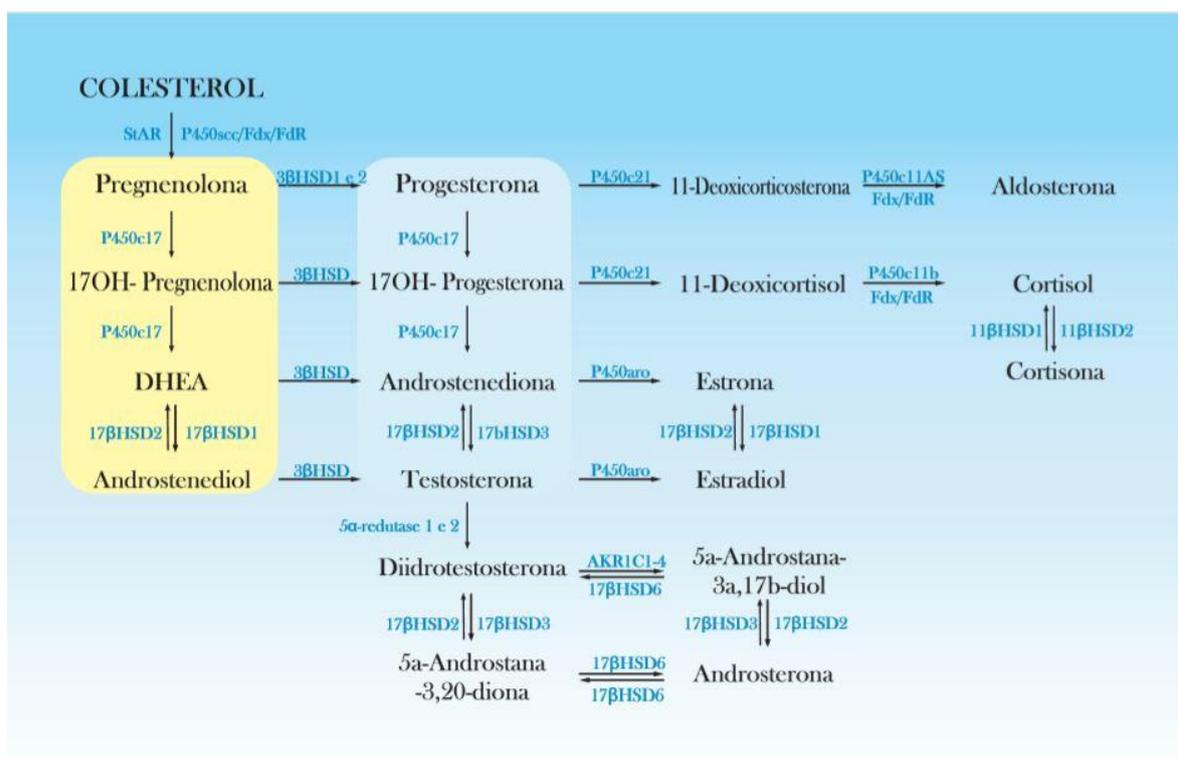


Figura 1 - Representação esquemática. Biossíntese e metabolismo dos hormônios esteroides. Fonte: MILLER; AUCHUS (2011)

Em humanos (nos testículos) ocorre baixa conversão de androstenediona por meio da via $\Delta 4$, tendo como intermediário a progesterona e 17α -hidroxiprogesterona. Isso ocorre devido a menor atividade enzimática sobre a 17α -hidroxiprogesterona em comparação com a atividade sobre o substrato 17α -hidroxipregnenolona o que diminui a produção de testosterona por essa via (FLÜCK; MILLER; AUCHUS, 2003). Ao contrário, em roedores a síntese de testosterona é predominantemente via $\Delta 4$ (FEVOLD *et al.*, 1989).

Além da produção de mineralocorticoides e glicocorticoides, as suprarrenais também sintetizam andrógenos. A zona reticular do córtex das suprarrenais possuem todas as enzimas necessárias para a produção dos andrógenos, contudo, para a etapa final, da formação da testosterona, há uma menor expressão das enzimas necessárias para conversão dos seus precursores em testosterona, de modo que pelas suprarrenais há predominância para síntese de DHEA e androstenediona (MILLER; AUCHUS, 2011; FLÜCK; PANDEY, 2014). É importante destacar que a biossíntese dos precursores de DHEA e androstenediona é de grande importância para a produção dos estrógenos, de forma que a deficiência na formação desses precursores pode não somente levar a deficiência na formação de testosterona, mas também diminuir a produção de estrógenos que, como consequência, leva a problemas de desenvolvimento e infertilidade (FLÜCK; PANDEY, 2014).

Após sua produção, a testosterona é rapidamente distribuída para os tecidos periféricos. Grande parte da testosterona sintetizada (cerca de 60 %) é transportada nos vasos sanguíneos ligada a sua proteína de ligação, SHBG (*sex hormone binding globulin*) e uma pequena quantidade (cerca de 0,5 – 4 %) permanece na sua forma livre (MENDEL, 1989). O restante da testosterona é transportado ligado a albumina (SIITERI *et al.*, 1982; MENDEL, 1989). A testosterona, na sua forma livre, pode sinalizar seus efeitos, agindo de forma clássica, interagindo com seu receptor (receptor de andrógeno - AR) que, por sua vez, interage com elemento responsivo aos andrógenos, no núcleo celular, para exercer seus efeitos (LEE *et al.*, 1999; CLAESSENS *et al.*, 2001).

A testosterona também pode desempenhar sinalização celular ligada à SHBG. Pertencente à família dos receptores acoplados a proteína G (NAKHLA *et al.*, 1999; ROSNERA *et al.*, 1999), o receptor para SHBG é encontrado em diversos tecidos (HRYB; KHAN; ROSNER, 1985; KRUPENKO; KRUPENKO; DANZO, 1994; FORTUNATI, 1999). A testosterona, uma vez ligada a sua globulina de transporte pode exercer suas ações, independente da interação com o ácido desoxirribonucleico (DNA), por meio da ativação do receptor para SHBG, levando ao aumento das concentrações de 3', 5'-adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e

ativação da proteína cinase dependente de AMP (PKA), dando início a várias sinalizações celulares (HEINLEIN; CHANG, 2002a). Além dessas, outras possibilidades de interação dos andrógenos com a célula alvo foram propostas por diversos autores, que vão desde a modulação de íons através da membrana plasmática ao aumento de segundos mensageiros de sinalização celular (KONOPLYA; POPOFF, 1992; BENTEN *et al.*, 1999a, 1999b; HEINLEIN; CHANG, 2002a; PERUSQUÍA; STALLONE, 2010; PERUSQUÍA *et al.*, 2015).

1.5. MECANISMOS DE AÇÃO DOS ANDRÓGENOS

Os andrógenos são primordiais para o desenvolvimento das características masculinas no período embrionário e para maturação sexual durante a puberdade (ROY *et al.*, 1999; HERALD *et al.*, 2017). Os hormônios sexuais masculinos também são essenciais para manutenção das funções reprodutoras masculinas, bem como para modular o comportamento na fase adulta, além de influenciar a atividade de diversos outros tecidos (HEEMERS; VERHOEVEN; SWINNEN, 2006). É conhecido que as ações clássicas dos andrógenos ocorram por meio da ligação do hormônio com seu receptor (AR), um membro da superfamília de receptores nucleares ativados por ligantes que atua como fator de transcrição (MANGELSDORF; EVANS, 1995), bem como pela ligação a outros receptores para esteroides, por exemplo: mineralocorticoides, glicocorticoides, estrogênio e receptores para progesterona (HEINLEIN; CHANG, 2002b).

Foram identificadas duas isoformas dos ARs que são codificados pelo mesmo gene, a saber: receptor de andrógeno-A (AR-A) com 732 aminoácidos, pesando 87 kDa e receptor de andrógeno-B (AR-B) com 919 aminoácidos, pesando 110 kDa (WILSON; MCPHAUL, 1994; LI; AL-AZZAWI, 2009). As isoformas dos ARs possuem funções distintas. Em células de origem mesenquimal (osteoblastos e fibroblasto de células epitelial do tecido genital) o receptor AR-B é responsável pela estimulação mitogênica por estímulos androgênicos que parece ser inibida pela ação do AR-A. (LIEGIBEL *et al.*, 2003). Além disso, o AR-A parece não ser capaz

de formar alta afinidade com o DNA para modular a expressão de genes responsivos aos andrógenos (LIEGIBEL *et al.*, 2003).

Sabe-se que os ARs são expressos em uma ampla variedade de tecidos (WILSON; MCPHAUL, 1996), não restrita às células que formam os tecidos dos sistemas reprodutivos masculino e feminino. Eles também são encontrados no tecido epitelial, cartilaginoso, glândulas sebáceas, células do músculo cardíaco, células do músculo liso vascular e nas células endoteliais (NEGRO-VILAR, 1999; LIU; DEATH; HANDELSMAN, 2003).

A via de sinalização “canônica” dos andrógenos, resumida na figura 2, envolve sua ligação com os ARs que modulam a transcrição gênica e síntese de proteína (GRINO; GRIFFIN; WILSON, 1990; BENNETT *et al.*, 2010). Essa interação (hormônio-receptor) promove uma alteração conformacional, conduzindo à translocação desse complexo para o núcleo celular, seguido da fosforização e formação de homodímero (CLAESSENS *et al.*, 2001) ou heterodímero (LEE *et al.*, 1999). Com esse complexo formado, dá-se início a sua interação com os elementos responsivos aos andrógenos, localizados em regiões reguladoras do gene alvo no DNA, envolvendo interações com co-ativadores e co-repressores (HIIPAKKA; LIAO, 1998), levando ao início da transcrição gênica (CLAESSENS *et al.*, 2001).

Um outro mecanismo pelo qual a testosterona pode desencadear seus efeitos está relacionado com a globulina de ligação a hormônio sexuais (SHBG). SHBG é uma importante glicoproteína com sítio de ligação para hormônios esteroides (HAMMOND; BOCCHINFUSO, 1996). Entretanto, além de possuir alta afinidade pelos andrógenos (SIITERI *et al.*, 1982; FORTUNATI, 1999), sua função vai além do transporte desses hormônios na circulação sanguínea (FORTUNATI, 1999). Tem sido demonstrado que a ativação desse complexo (SHBG ligada/testosterona com seu receptor) resulta em um rápido aumento, não-genômico, da concentração intracelular de cAMP (ROSNER *et al.*, 1998; NAKHLA *et al.*, 1999; HEINLEIN; CHANG, 2002a) e posterior ativação da PKA (HEINLEIN; CHANG, 2002a). Como resultado dessa interação, foi observado aumento do crescimento celular em

linhagem celular de câncer de próstata humano (NAKHLA; ROSNER, 1996), bem como aumento da atividade transcricional do AR (HEINLEIN; CHANG, 2002a).

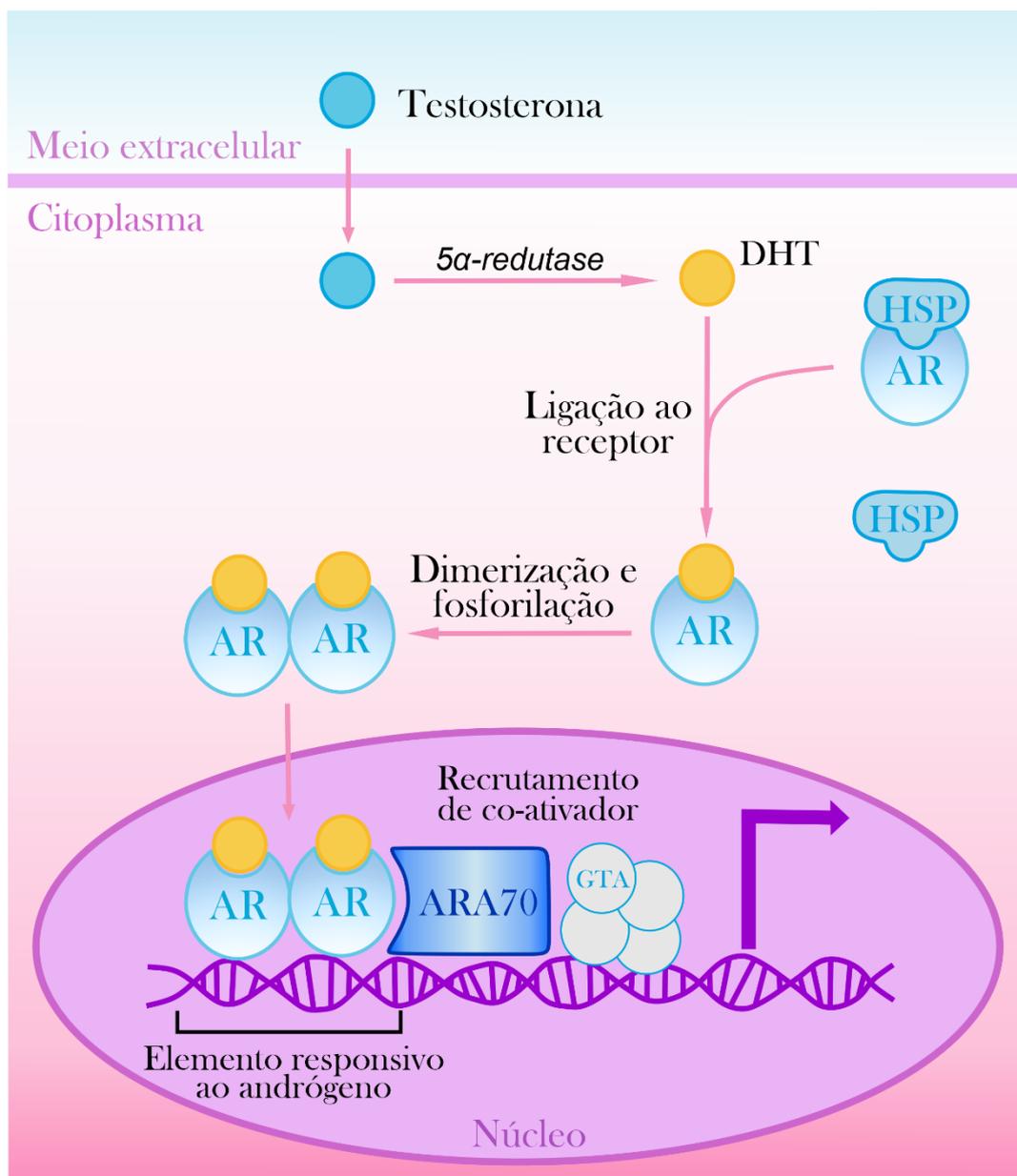


Figura 2 – Representação esquemática. Mecanismos de ação genômica dos andrógenos. Fonte: BENNETT *et al.* (2010)

Em 2010 foi sugerido que a ativação do GPRC6A (PI *et al.*, 2010; PI; PARRILL; QUARLES, 2010), um receptor de membrana, membro da família de receptores acoplados a proteína G, clonado em 2004 (WELLENDORPH; BRÄUNER-OSBORNE, 2004) pudesse mediar efeitos não-genômicos da testosterona (PI *et al.*, 2010; PI; PARRILL; QUARLES, 2010). O GPRC6A é expresso em vários tipos de células, entre elas: as células estromais da medula óssea, monócitos, células

musculares esqueléticas, células de Leydig (PI *et al.*, 2015), células da musculatura lisa vascular e endotelial (HARNO *et al.*, 2008). Também foi demonstrado que artérias mesentéricas de ratos expressam GPRC6A e sua ativação pode resultar na hiperpolarização e, por consequência, relaxamento vascular, efeito que é perdido após remoção do endotélio (HARNO *et al.*, 2008). O GPRC6A parece exercer seus efeitos de maneira independente das interações com os receptores clássicos (ARs), mediando a fosforilação de várias proteínas com atividade quinase (CATO; NESTL; MINK, 2002; PI; PARRILL; QUARLES, 2010; HERALD *et al.*, 2017). Em recente revisão (CRUZ-TOPETE; DOMINIC; STOKES, 2020), a testosterona foi associada tanto a efeitos pró-oxidantes, por meio da sua ligação direta ao GPRC6A, quanto a efeitos antioxidantes, de maneira indireta, via aromatização, por meio do estímulo do receptor de estrogênio acoplado a proteína G (GPER), assim, levando a uma diminuição do estresse oxidativo.

Ainda acerca das ações da testosterona, tem sido sugerido que o *transient receptor potential cation channel 8* da subfamília M (melastatina) (TRPM8) seja um receptor de membrana para testosterona (ASUTHKAR *et al.*, 2015a). TRPM8 é bem conhecido como um canal para cátion, com alta seletividade ao íon cálcio, bem caracterizado como um sensor neuronal que pode desempenhar um papel de receptor do frio e do mentol, sendo importante como mediador da dor no sistema nervoso periférico (PEIER *et al.*, 2002). TRPM8 pode participar do sistema de termorregulação de modo que a redução da temperatura corporal é observada após administração de antagonistas para esse receptor (ALMEIDA *et al.*, 2012) e sua ativação está relacionada ao aumento da temperatura corporal (TAJINO *et al.*, 2011). Não obstante, estudos têm sugerido que o TRPM8 pode desempenhar o papel de receptor de membrana para testosterona (ASUTHKAR *et al.*, 2015a, 2015b), sendo ele capaz de mediar a redução do estresse oxidativo, o que o faz um alvo terapêutico promissor para o tratamento de doenças cardiovasculares (HUANG *et al.*, 2017).

Ainda, no que se refere às ações não-genômicas, estudos têm se empenhado em demonstrar que os andrógenos podem exercer ações vasculares em uma ampla variedade de segmentos arteriais. Essas respostas são caracterizadas por

promover respostas rápidas, levando ao relaxamento em aorta torácica de ratos (BUCCI *et al.*, 2009) e artéria coronária de porco (DEENADAYALU *et al.*, 2012). Além disso, foi demonstrado que a testosterona foi capaz de promover relaxamento da artéria basilar de cães (RAMÍREZ-ROSAS *et al.*, 2011), microvasos mesentéricos de ratos (PUTTABYATAPPA *et al.*, 2013) e aumento da reatividade miogênica em artéria mesentérica de segunda ordem de ratos (TOOT *et al.*, 2011). Todos esses efeitos foram caracterizados como uma ação rápida, não genômica. Juntos, esses trabalhos mostram a capacidade dos andrógenos em modular a função vascular por diversos mecanismos (PERUSQUÍA; STALLONE, 2010), os quais estão resumidos na figura 3.

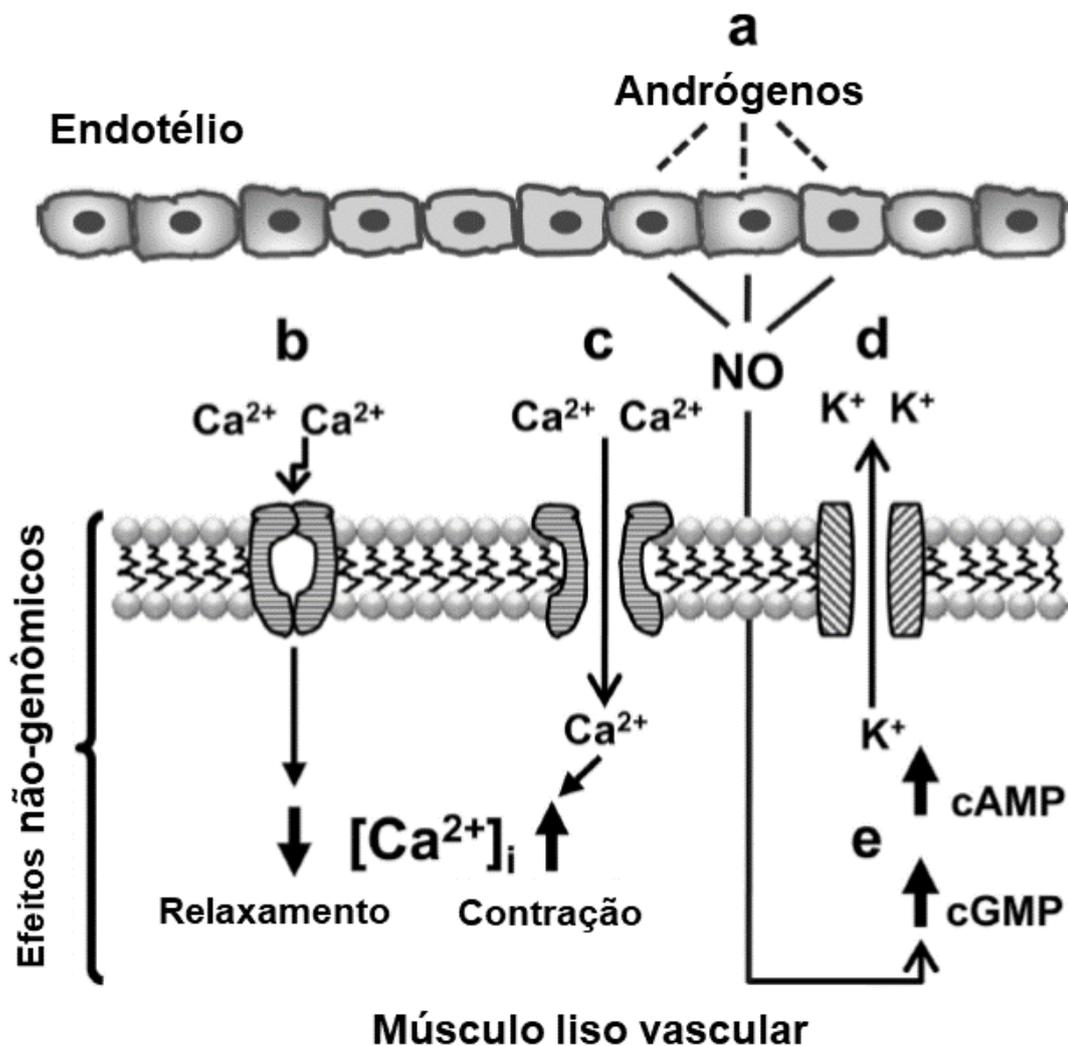


Figura 3 – Representação esquemática. Mecanismos de ação não-genômica dos andrógenos nas células vasculares. a: mecanismo dependente do endotélio, possivelmente envolvendo fatores de relaxamento derivados do endotélio (principalmente o óxido nítrico - NO), que parece estar envolvido no relaxamento vascular. O aumento do cGMP promovido pelo NO induz ao relaxamento da musculatura lisa vascular. b: Em condições fisiológicas, andrógenos podem agir diretamente como

antagonistas de canais para Ca^{2+} promovendo relaxamento vascular pela diminuição do influxo de Ca^{2+} . c: Andrógenos, em concentrações suprafisiológicas podem aumentar a probabilidade de abertura de canais para Ca^{2+} aumentando a concentração intracelular de Ca^{2+} induzindo a vasoconstrição. d: Andrógenos podem estimular a probabilidade de abertura de canais para potássio, hiperpolarizando as células do músculo liso vascular e posterior relaxamento. e: Andrógenos são capazes de aumentar a produção de cGMP e cAMP. Modificado de PERUSQUÍA; STALLONE, 2010.

1.6. FUNÇÃO VASCULAR DOS ANDRÓGENOS

Os hormônios sexuais masculinos podem interagir com o endotélio ou com músculo liso vascular por diversas formas, estimulando segundos mensageiros e, assim, participam da formação de fatores vasoativos (MENDELSON; KARAS, 2005). Estudos conduzidos na década dos anos 90 sugerem que a diminuição dos níveis de testosterona se relaciona com a melhora da função endotelial em homens adultos (HERMAN *et al.*, 1997). Os efeitos deletérios sobre a função vascular promovidos pelos andrógenos puderam ser observados em uma grande variedade de modelos experimentais, com utilização de diferentes abordagens metodológicas, tanto em modelos de animais machos (SCHRÖR *et al.*, 1994; TEOH *et al.*, 2000) quanto fêmeas (ADAMS; WILLIAMS; KAPLAN, 1995; MCCREDIE *et al.*, 1998; TEOH *et al.*, 2000; COSTA *et al.*, 2015). Também já foi demonstrado que a associação de testosterona ao tratamento com estrogênio reduz os benefícios do estrogênio sobre a função endotelial de ratas ovariectomizadas e aumenta a formação de espécies reativas de oxigênio via subunidade p47phox da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (COSTA *et al.*, 2015). Além disso, os andrógenos parecem exercer um papel importante no desenvolvimento e manutenção da hipertensão arterial (RECKELHOFF; ZHANG; GRANGER, 1997; MARANON; RECKELHOFF, 2013), que pode envolver alterações da função renal (RECKELHOFF; ZHANG; GRANGER, 1998), participação dos receptores de andrógenos (RECKELHOFF *et al.*, 1999), estimulação do sistema renina angiotensina aldosterona (RECKELHOFF; ZHANG; SRIVASTAVA, 2000), além de, diretamente, participar no aumento do estresse oxidativo (ILIESCU *et al.*, 2007; TOSTES *et al.*, 2016).

Por outro lado, muitos estudos realizados após os anos 2000 apontaram outro ponto de vista sobre a ação vascular dos andrógenos, no qual eles parecem exercer efeitos benéficos no sistema vascular, tanto em estudos envolvendo seres humanos quanto em animais experimentais. (WU; VON ECKARDSTEIN, 2003; TRAISH; GALOOSIAN, 2013; TRAISH, 2014). Diante desse cenário, observa-se que não há clareza acerca das ações dos andrógenos, principalmente sobre o sistema vascular, onde suas ações aparentam ser controversas, o que demanda uma atenção maior por parte da comunidade científica (LOPEZ; CANFIELD; WANG, 2016; LOO *et al.*, 2017). Nesse sentido, estudos demonstraram um importante papel da testosterona e seus metabólitos na regulação do tônus vascular, de modo a atuarem tanto como agentes anti-hipertensivos quanto hipotensores (PERUSQUÍA *et al.*, 2017), oferecendo benefícios ao sistema vascular, mesmo em modelos hipertensivos (PERUSQUÍA *et al.*, 2017; ISIDORO; FERRER; PERUSQUÍA, 2018).

É conhecido que os andrógenos podem modular a função vascular por vários mecanismos (genômicos e não-genômicos). De maneira genômica, já foi demonstrado que a testosterona pode modular a expressão da óxido nítrico sintase (NOS) (MARIN *et al.*, 1999; SKOGASTIERNA *et al.*, 2014), enzima que atua na formação de óxido nítrico (NO), um importante fator relaxante derivado do endotélio (FÖRSTERMANN; LI, 2011) e induzir a proliferação de células endoteliais (WILLIAMS *et al.*, 2004). Além disso, foi demonstrado que a diminuição dos níveis de andrógenos circulantes promoveu *downregulation* dos canais para potássio, fundamentais para o efluxo de potássio e, por consequência, hiperpolarização das células do músculo liso vascular (ZHOU *et al.*, 2008; RAMÍREZ-ROSAS *et al.*, 2011). Em estudo conduzido por nosso laboratório foi demonstrado que a redução dos níveis de andrógeno, provocada pela remoção cirúrgica dos testículos, em ratos, promoveu prejuízo na vasodilatação dependente do endotélio do leito vascular coronariano em animais normotensos, efeito que foi revertido após tratamento com testosterona (ROUVER *et al.*, 2015). Assim, fica evidenciado o importante papel dos andrógenos na manutenção da função vascular.

No que se refere as ações não-genômicas, sabe-se que a testosterona pode exercer seus efeitos por meio da interação com seu receptor (AR) (DEENADAYALU *et al.*,

2012; PUTTABYATAPPA *et al.*, 2013), bem como de maneira independente da ligação com AR (JONES *et al.*, 2004; ÁLVAREZ *et al.*, 2010). Também é conhecido que essas ações podem ter seu início desencadeado por interações com a membrana plasmática (DING; STALLONE, 2001), bem como por interações dos andrógenos no citoplasma, levando ao aumento da concentração do íon cálcio e ativando diversas proteínas quinases (BARON *et al.*, 2004; FORADORI; WEISER; HANDA, 2008; LI; AL-AZZAWI, 2009; DEENADAYALU *et al.*, 2012). Os efeitos dos andrógenos ainda podem ocorrer por meio da interação direta dos andrógenos com as células endoteliais (TEP-AREENAN; KENDALL; RANDALL, 2002), bem como agindo diretamente sobre o músculo liso vascular (DEENADAYALU *et al.*, 2012). Todos esses estudos evidenciam a versatilidade dos andrógenos em agirem sobre o sistema vascular.

Os receptores clássicos para andrógenos, pelo menos em parte, participam do processo de controle do tônus vascular, uma vez que a ativação desses receptores, pela testosterona, pode aumentar o NO em células endoteliais aórticas de humanos (YU *et al.*, 2010). A participação do AR também foi observada na vasodilatação de microvasos de artérias mesentéricas de ratos machos, onde a ligação da testosterona com seu receptor foi capaz de promover sinalização intracelular, de modo a estimular tanto a NOS (aumentando NO) quanto a enzima xantina oxidase (levando a formação de ânion superóxido - $O_2^{\bullet-}$), de modo que o produto da interação do NO com $O_2^{\bullet-}$, o peroxinitrito ($ONOO^-$) (ZOU; SHI; COHEN, 2002), foi capaz de elevar a concentração de 3' 5' – guanosina monofosfato cíclico (cGMP) seguido de relaxamento vascular (PUTTABYATAPPA *et al.*, 2013). A participação via NO, no relaxamento vascular independente dos receptores para andrógenos, também foi demonstrado. Em ratos Sprague-Dawley machos, pode ser visto um aumento da atividade da isoforma neuronal da NOS após administração de testosterona (PERUSQUÍA *et al.*, 2015). No mesmo sentido, em anéis de artéria mesentérica de resistência, a testosterona produziu aumento da formação de NO, e consequente relaxamento vascular, que foi revertido em anéis tratados com inibidor específico para isoforma neuronal da NOS em ratos Sprague-Dawley deficientes para receptor de andrógenos (WHITE; SELLERS; STALLONE, 2008).

Embora a ação dos andrógenos seja considerada controversa, a privação desses hormônios levou ao aumento gradativo da pressão arterial de ratos após a quinta semana de gonadectomia tanto em animais hipertensos (PERUSQUÍA *et al.*, 2017), quanto normotensos (PERUSQUÍA; CONTRERAS; HERRERA, 2019). Desta forma, podemos observar que fatores como a idade podem contribuir para o não esclarecimento de seus efeitos.

1.3 ANDRÓGENOS E IDADE

A comunidade científica tem se esforçado na investigação dos efeitos dos andrógenos sobre o sistema vascular e o controle pressórico, contudo sua função sobre ambos ainda não está totalmente esclarecida. Isso se torna ainda mais evidente uma vez que a redução da concentração de andrógenos no plasma, em modelos de animais orquiectomizados, pode se correlacionar tanto com aumento (PERUSQUÍA *et al.*, 2017) quanto diminuição (LOH; SALLEH, 2017) de valores pressóricos. A participação dos andrógenos na modulação do tônus vascular parece ter uma relação com sua concentração plasmática, que tende a diminuir com a idade (DALMASSO *et al.*, 2017). Em animais hipertensos jovens (12 semanas de idade), por exemplo, a administração de testosterona promoveu um aumento da pressão arterial média. Por outro lado, quando essa análise foi feita em animais mais velhos (21–22 meses de idade) o tratamento com testosterona foi capaz de reduzir os valores pressóricos (DALMASSO *et al.*, 2017).

O declínio da função fisiológica relacionado à idade é um fenômeno que ocorre em todos os sistemas orgânicos, de modo que o envelhecimento também está associado ao aumento de diversos fatores que podem ser prejudiciais a funcionalidade vascular (UNGVARI *et al.*, 2018). Vários estudos clínicos mostraram que a vasodilatação dependente do endotélio diminui progressivamente com a idade (HATAKE *et al.*, 1990; EGASHIRA *et al.*, 1993; TADDEI *et al.*, 1995; SINGH *et al.*, 2002). Essa observação tem sido consistentemente feita em artérias de condutância, tanto em estudos *in vivo* com artéria braquial de pacientes hipertensos e normotensos (TADDEI *et al.*, 1995), quanto em estudos *ex vivo*, onde foi

observada reatividade de artéria basilar isolada de cadáveres humanos (HATAKE *et al.*, 1990). O mesmo também foi observado em artérias coronárias de resistência, onde foi observado diminuição do relaxamento dependente do endotélio como efeito do envelhecimento (EGASHIRA *et al.*, 1993). Além disso, foi observado que o processo de envelhecimento acompanha prejuízo na via de relaxamento mediada pelo endotélio, NO e prostanoídes (PNs) vasodilatadores, para o controle do fluxo das artérias do antebraço. (SINGH *et al.*, 2002). Todos esses resultados convergem no sentido de que o envelhecimento está associado à redução da vasodilatação dependente do endotélio e essa relação de prejuízo vascular parecer ocorrer mais cedo em homens cuja função endotelial começa a declinar a partir da 4ª década de vida (CELERMAJER *et al.*, 1994)

O processo de envelhecimento está fortemente relacionado ao aumento do estresse oxidativo por meio da produção de espécie reativa de oxigênio via NADPH oxidase (VAN DER LOO *et al.*, 2000; ADLER *et al.*, 2003; DONATO *et al.*, 2007; JACOBSON *et al.*, 2007) e da cadeia respiratória mitocondrial (CSISZAR *et al.*, 2012; CSISZAR *et al.*, 2014) o que contribuem para a disfunção endotelial tanto em modelos que utilizam animais experimentais (CSISZAR *et al.*, 2007; UNGVARI *et al.*, 2007) quanto em estudos clínicos (DONATO *et al.*, 2007; JABLONSKI *et al.*, 2007). Além disso, diversos autores têm demonstrado que, no sistema vascular, a biodisponibilidade reduzida do NO tem relação direta com a idade, de modo que com o avançar da idade ocorre diminuição da biodisponibilidade do NO (VAN DER LOO *et al.*, 2000; CSISZAR *et al.*, 2002; SUN *et al.*, 2004), bem como maior sensibilidade contrátil (NOVELLA *et al.*, 2013).

Como pode ser visto, os estudos acerca dos efeitos dos andrógenos sobre o sistema cardiovascular não são conclusivos, necessitando de mais esclarecimentos sobre seu papel, principalmente no que se refere aos efeitos desses hormônios na vasculatura com o avançar da idade. Diante do fato que os andrógenos podem promover efeitos benéficos ao sistema vascular, como por exemplo, melhorar a função endotelial (MARIN *et al.*, 1999; SKOGASTIERNA *et al.*, 2014; ROUVER *et al.*, 2015), bem como efeitos deletérios, de modo a prejudicar o relaxamento vascular (ADAMS; WILLIAMS; KAPLAN, 1995; MCCREDIE *et al.*, 1998; SCHRÖR

et al., 1994; TEOH *et al.*, 2000) e aumentar o estresse oxidativo (TOSTES *et al.*, 2016), estudos se fazem necessários para melhor elucidação das ações dos hormônios sexuais masculinos. Além disso, não está claro quais alterações podem ocorrer no sistema vascular, na presença dos hormônios sexuais masculinos, bem como quando essas possíveis alterações começariam a se manifestar. Nossa hipótese é que a presença dos andrógenos, no decorrer da idade, seja capaz de prejudicar a reatividade vascular de artérias mesentéricas de resistência. Sendo assim, com a finalidade de testar nossa hipótese, o objetivo deste estudo foi fazer uma avaliação temporal da reatividade vascular de artérias mesentéricas de terceira ordem, a fim de esclarecer a participação dos andrógenos na função vascular em ratos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito temporal dos hormônios sexuais masculinos na reatividade vascular de artérias mesentéricas de terceira ordem de ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a capacidade de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh) em artérias mesentéricas de terceira ordem de ratos Sham e orquiectomizados (ORX) entre 15 e 75 dias pós intervenção cirúrgica.
- Investigar a participação dos mediadores endoteliais de relaxamento (NO, PN e hiperpolarização dependente do endotélio - EDH) no relaxamento dependente do endotélio em artérias mesentéricas de terceira ordem de ratos Sham e ORX entre 15 e 75 dias pós intervenção cirúrgica;
- Avaliar a capacidade contrátil em artérias mesentéricas de terceira ordem de ratos Sham e ORX entre 15 e 75 dias pós intervenção cirúrgica.
- Investigar possíveis alterações histomorfométricas e ultraestruturais em artérias mesentéricas de terceira ordem de ratos entre 15 e 75 dias pós intervenção cirúrgica.
- Verificar a produção de NO, O_2^{\bullet} e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em artérias mesentéricas de terceira ordem de ratos entre 15 e 75 dias pós intervenção cirúrgica.
- Verificar a pressão arterial de ratos Sham e ORX entre 15 e 75 dias pós intervenção cirúrgica.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para este estudo, foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), com oito semanas de idade, fornecidos pelas instalações de animais do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as recomendações das diretrizes brasileiras para o cuidado e uso de animais para fins científicos e didáticos e as diretrizes para a prática de eutanásia (BRASIL, 2016) com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFES (CEUA/UFES) sob protocolo, #07/2016. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, grupos de quatro animais por gaiola, sob condições controladas de temperatura (22–24 °C) e umidade (40–60 %). Um ciclo claro-escuro foi estabelecido de 12/12 horas e os animais tinham livre acesso ao fornecimento de água e comida (dieta padrão para animais alojados, Purina Labina, SP, Brasil). Os animais foram divididos em controle (Sham) e orquiectomizado (ORX). Os protocolos experimentais foram iniciados 15, 30, 60 ou 75 dias após procedimento de orquiectomia ou cirurgia fictícia.

3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.2.1 Orquiectomia

A remoção dos testículos foi realizada de acordo com o trabalho previamente descrito pelo nosso laboratório (ROUVER *et al.*, 2015) e está esquematicamente representada na figura 4. Após realização da anestesia, com associação de cetamina (70 mg/kg, *i.p.*) e xilazina (10 mg/kg, *i.p.*), os animais foram colocados em decúbito dorsal, sobre prancha cirúrgica. Após desinfecção da bolsa testicular, com álcool iodado, foi realizada incisão na linha média da bolsa testicular e os testículos foram expostos. Em seguida, os testículos foram ligados, com utilização de suturas absorvíveis, em torno do cordão espermático. Posteriormente, os testículos foram removidos e a bolsa testicular suturada. Os animais do grupo Sham foram

submetidos a cirurgia fictícia seguindo os mesmos procedimentos, exceto remoção dos testículos. Ao final do procedimento cirúrgico, todos os animais receberam dose de antibiótico (enrofloxacin, 2,5 %, 0,1 mL, *i.m.*) e analgésico (dipirona sódica, 100 mg/Kg, *v.o.*) para evitar infecção e dor, respectivamente.

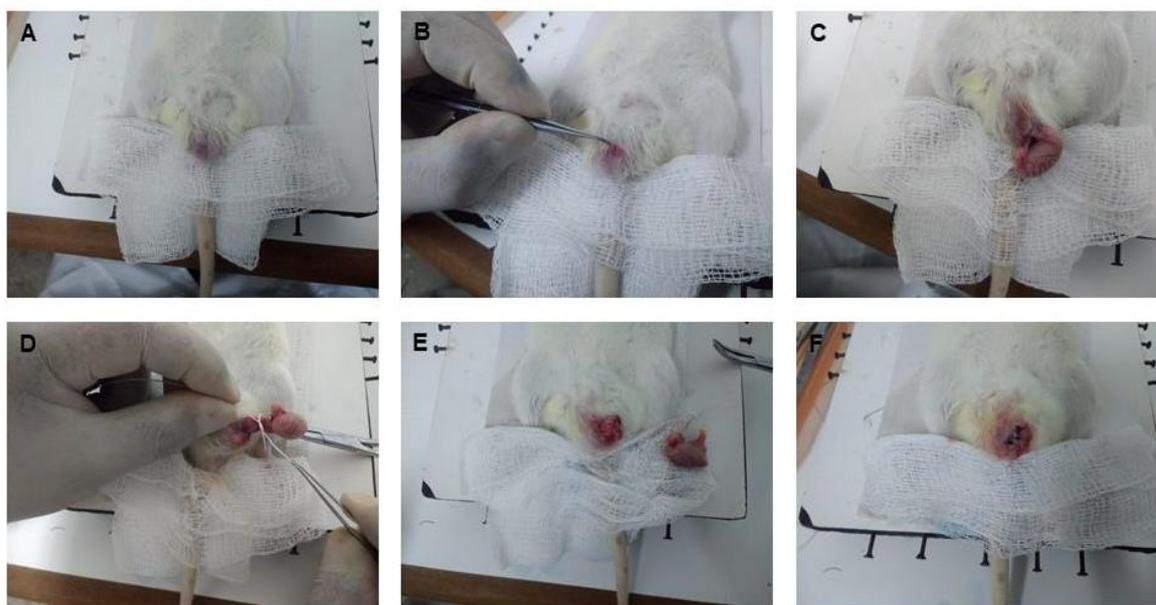


Figura 4 - Esquema representativo das etapas da orquiectomia. (A) preparação do campo operatório, (B) incisão na linha média da bolsa testicular, (C) exposição do testículo, (D) ligadura em torno do cordão espermático. (E) remoção do testículo e (F) sutura da bolsa testicular.

3.2.2 Reatividade Vascular

A reatividade vascular das artérias mesentéricas de terceira ordem foi avaliada por meio de miógrafo de resistência (620 M; Danish Myo Technology, Aarhus, Denmark). Os protocolos foram realizados de acordo com método previamente descrito por Mulvany & Halpern (MULVANY; HALPERN, 1977). Com objetivo de evitar interferência na fase sustentada da resposta contrátil, os animais foram eutanasiados por decapitação, sem administração de anestesia (HATANO *et al.*, 1989) e exsanguinados. Em seguida, o leito mesentérico foi localizado, removido e posto em placa de Petri contendo solução nutritora (solução de Krebs) resfriada a 4 °C, contendo: NaCl, 119 mM; KCl, 4.7 mM; KH₂PO₄, 0,5 mM; NaHCO₃, 13,4 mM; MgSO₄.7H₂O, 1,17 mM; CaCl₂.2H₂O, 2,5 mM e 5,5 mM de glicose. Além disso,

foram removidos órgãos e tecidos de interesse que permaneceram em estufa aquecida a 100 °C por 24 horas para avaliação do peso seco. Os ramos de terceira ordem do leito mesentérico foram identificados, isolados e dissecados do tecido adjacente com auxílio de um estereomicroscópio (lupa) para dissecação (BEL Photonics STM Pro).

Os segmentos vasculares dissecados foram cortados em 2 mm de comprimento e montados com auxílio de 2 fios de tungstênio (40 µm de diâmetro) nas câmaras de banho de órgão (Figura 5) contendo solução de Krebs mantida a 37 °C e constantemente aerada com uma mistura carbogênica (95 % O₂ e 5 % CO₂). Um fio, transpassado pela luz do segmento vascular, foi montado numa haste fixa acoplado a um micrômetro e o segundo fio, também transpassado pela luz vascular, foi montado numa haste móvel conectada a um transdutor de força isométrica. Em seguida, os segmentos arteriais foram gradualmente estirados até que seus diâmetros internos correspondessem a uma pressão transmural de 100 mmHg (IC100), então a circunferência interna (IC1) foi normalizada para uma fração definida de IC100 (Figura 6). Para tanto, o IC1 foi calculado a partir da multiplicação do IC100 por um fator (0,9) que permitisse ao segmento vascular máxima produção de força ativa, bem como a sensibilidade aos agonistas. Para artérias mesentéricas de ratos, tem sido utilizado 0,9 como fator de normalização (SLEZÁK *et al.*, 2010). Após procedimento de normalização os segmentos vasculares foram lavados três vezes a cada 15 minutos e após 45 minutos de estabilização foram estimulados duas vezes com agonista contrátil (fenilefrina - PE, 3 µM) para obter respostas contráteis reproduzíveis. A viabilidade e integridade endotelial foram avaliadas pela administração de ACh (10 µM) em anéis previamente contraídos por PE (3 µM). O endotélio foi considerado viável e intacto quando a resposta de relaxamento à ACh observada atingia ≥ 80 % da contração obtida com PE.

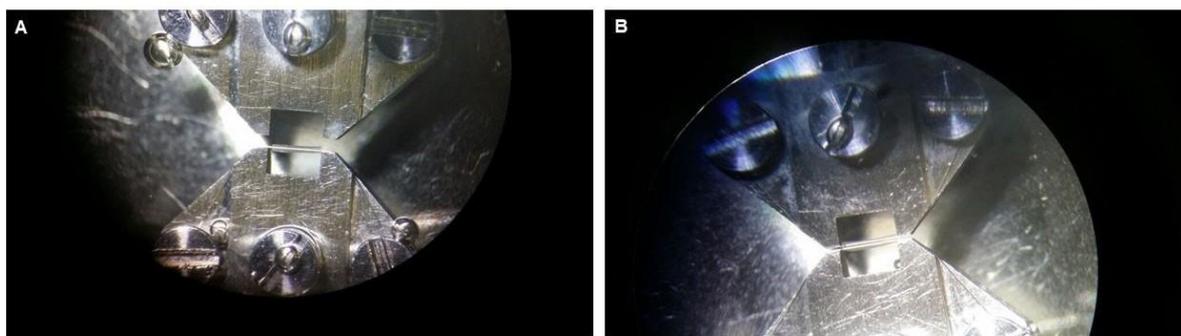


Figura 5 - Esquema representativo da fixação do segmento arterial com 2 mm de comprimento no miógrafo de resistência. (A) fixação do primeiro fio de tungstênio, acoplado a uma haste fixa e (B) fixação do segundo fio, acoplado a uma haste móvel conectada a um transdutor de força isométrica.

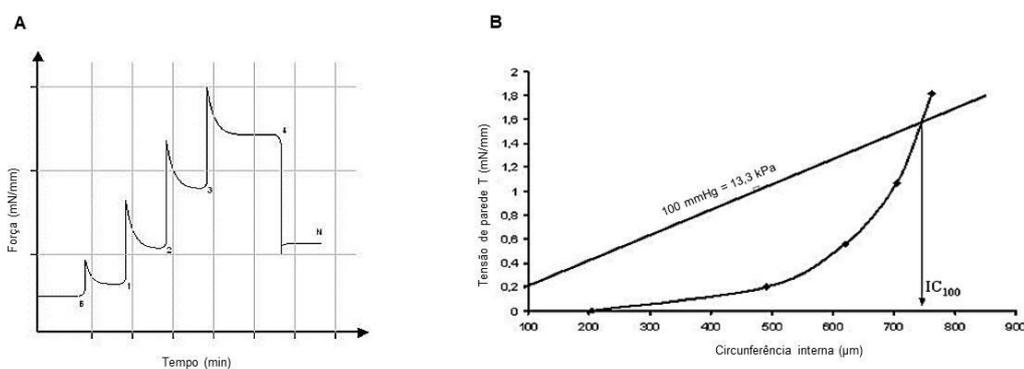


Figura 6 - Esquema representativo do processo de normalização. (A) Ilustração do procedimento de normalização gradual e (B) ilustração do ajuste da curva para determinação do IC100. Adaptado do manual de utilização: Wire Myograph System - 620m - user guide.

Após teste do endotélio os vasos passavam por um período de 30 minutos de estabilização e curvas concentração-resposta foram obtidas por meio de doses cumulativa de ACh (0,1 nM - 10 μ M), após a indução prévia de contração com PE (3 μ M). O efeito vasodilatador da ACh foi investigado ante e após utilização de N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME 300 μ M; Sigma, St. Louis, MO – USA), inibidor não seletivo para NOS ou indometacina (INDO, 10 μ M; Sigma, St. Louis, MO – USA), inibidor inespecífico para ciclooxigenase (COX). Os inibidores foram administrados individualmente ou de maneira combinada. Após 30 minutos de incubação dos inibidores a curva de relaxamento a ACh foi repetida. Os protocolos de reatividade vascular estão esquematicamente representados na figura 7. Para avaliação da participação dos mediadores endoteliais foi realizado cálculo do *delta* da área abaixo da curva (*area under curve* – AUC), com auxílio de um programa

estatístico (GraphPad Prism 6 - GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) antes e após utilização dos inibidores. Para análise da capacidade contrátil dos seguimentos vasculares, foi realizada curva concentração-resposta à PE (1nM - 100µM). Os registros foram adquiridos por meio de um sistema de aquisição de dados (LabChart 8, AD Instruments Pty Ltd., New South Wales, Australia) acoplado a um computador.

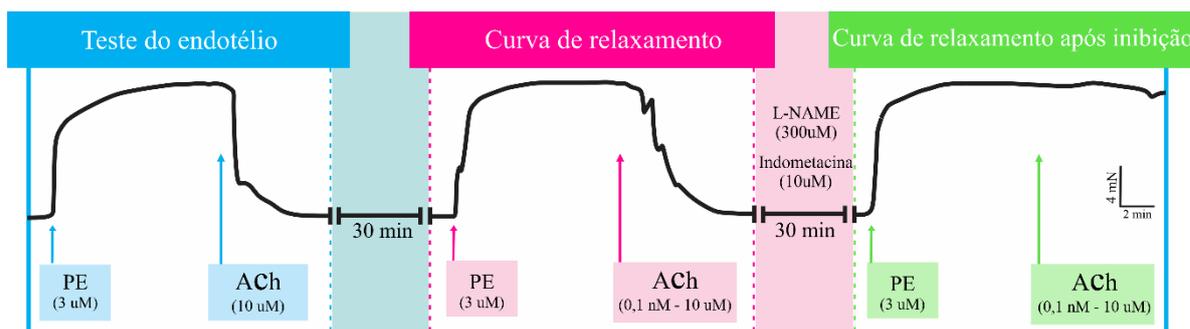


Figura 7 - Fluxograma. Representação esquemática dos protocolos de reatividade vascular.

3.2.3 Histomorfometria

As artérias mesentéricas de terceira ordem foram removidas e fixadas em tampão fosfato salina (PBS)-formalina à temperatura ambiente entre 24 a 48 horas. As artérias foram incluídas em parafina até seu uso. Seções das artérias mesentéricas foram cortadas entre 5-7 µm e coradas com eosina-hematoxilina e examinadas quanto aos parâmetros morfológicos, de acordo com a literatura (XIMENES *et al.*, 2017). Um sistema de análise histomorfométrica de imagens foi utilizado com uma câmera digital (Axio-Cam ERc 5S) acoplada a um microscópio de luz (Olympus AX70; Olympus, Center Valley, PA). Imagens de alta resolução (2048×1536 pixels) foram capturadas utilizando *software* Carl Zeiss AxioVision Rel. 4.8. As fotomicrografias foram analisadas usando uma objetiva 20x. A espessura da parede dos vasos mesentéricos e o lúmen foram calculadas por meio do *software* ImageJ.

3.2.4 Análise da densidade de colágeno

Seções da artéria mesentérica de terceira ordem foram coradas com *Picrosirius red* e 15 fotomicrografias de tecido mesentérico foram obtidas usando a objetiva de 20x. Todas as áreas analisadas foram escolhidas aleatoriamente e as áreas sem túnica vascular foram evitadas. As imagens foram convertidas em imagens preto e branco de alto contraste para visualizar fibras colágenas coradas. Posteriormente, as imagens foram analisadas com o *software* ImageJ. Os resultados representam a quantidade relativa de colágeno na parede do vaso como previamente descrito (DOS SANTOS *et al.*, 2012).

3.2.5 Microscopia eletrônica de varredura

As artérias mesentéricas de terceira ordem foram coletadas, abertas longitudinalmente, lavadas por 10 minutos com PBS e fixadas com 2,5 % glutaraldeído. As artérias foram então pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1 %, ferricianeto de potássio a 3,8 % e CaCl_2 2,5 mM, desidratadas em acetona e incorporadas no Epon 812. As seções ultra-finas foram examinadas ao microscópio Zeiss EM 10C. Para microscopia eletrônica de varredura, os esferoides foram secos usando o método do ponto crítico e revestidos com uma camada de ouro de 20 nm e examinados sob um microscópio Zeiss 940 DSM (DOS SANTOS *et al.*, 2012).

3.2.6 Avaliação dos níveis de NO, $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2

Os níveis de NO, $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 foram medidos por microscopia de fluorescência em cortes das artérias mesentéricas de terceira ordem. A medida dos níveis de NO (COSTA *et al.*, 2018), $\text{O}_2^{\bullet-}$ (GIESEN *et al.*, 2020) e H_2O_2 (PEIXOTO *et al.*, 2018) foram realizadas como previamente descritas com algumas modificações. Segmentos arteriais foram cuidadosamente removidos e embebidos em um líquido de crioproteção (Tissue-Tek® OCT™, Sakura®, USA) e mantidos a -80°C até sua utilização. Em seguida, cortes transversais (10 μm) foram obtidos utilizando

criostato (Leica 1850, Leica, USA). As lâminas contendo tecido vascular foram equilibradas por 10 minutos em tampão fosfato (0,1 mM, pH = 7,4) contendo CaCl_2 (0,45 mM).

A produção NO foi mensurada por meio de uma sonda fluorescente, diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA, Sigma-Aldrich, 10 μM). As seções foram incubadas com DAF-2DA em câmara úmida sob abrigo da luz a 37 °C. Após 30 minutos de incubação, as seções de cada artéria foram avaliadas em sua produção basal de NO na ausência ou presença de controle negativo (L-NAME - 300 μM). Para avaliação dos níveis de $\text{O}_2^{\bullet-}$, a sonda dihidroetidina (Dihidroetideo - DHE; Invitrogen; 5 μM) foi usada. Para tanto, as lâminas foram incubadas com DHE por 30 minutos ao abrigo de luz a 37 °C. Após esse tempo, foi avaliada a produção basal de $\text{O}_2^{\bullet-}$ na ausência ou presença de um controle negativo (tiron -10 μM). Para detecção da produção de H_2O_2 , a sonda fluorescente diacetato de 2', 7' diclorodihidrofluoresceína (H2DCF-DA; Life Technologies; 10 μM) foi utilizada. Assim, lâminas com tecido vascular foram incubadas com H2DCF-DA por 30 minutos ao abrigo de luz a 37 °C. Após esse tempo, foi avaliada a produção basal de H_2O_2 , na ausência ou presença de um controle negativo (catalase - 1000 unidades/mL).

Todas as Imagens digitais foram adquiridas por meio de microscópio de fluorescência (Zeiss, Axio Observer Z1), equipado com filtro fluorescente e uma câmera AxioCam MRm usando objetiva de 40x. A intensidade de fluorescência foi mensurada pelo *software* ImageJ e expressa em unidades arbitrárias (u.a.).

3.2.7 Avaliação da pressão arterial

A avaliação não invasiva da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada como descrito previamente (BALDO *et al.*, 2011). Após período de adaptação, os animais foram mantidos em câmara aquecida, contidos em contentor de acrílico, com um *cuff* de pulso pneumático acoplado à região proximal da cauda. Um esfigmomanômetro foi insuflado e desinsuflado automaticamente e o valor de PAS foi obtido por meio de um sistema de aquisição de dados (IITC INC/Life Science,

23924 Victory Blvd, Woodland Hills, CA 91367–1253 USA), com transdutor de pressão acoplado a um computador. A temperatura foi mantida entre 29 °C e 32 °C, por 40 minutos, tempo em que os animais permaneceram sob avaliação. A média de três registros com diferença máxima de 10 mmHg foi obtida, sendo descartados os registros associados às influências causadas pela movimentação do animal.

A avaliação invasiva (direta) da pressão arterial foi realizada por meio de um cateter inserido na artéria femoral, como previamente descrito (FRANQUNI *et al.*, 2013) com algumas modificações. Para tanto, no dia anterior a avaliação, os animais foram anestesiados com cetamina (70 mg/kg, *i.p*) e xilazina (10 mg/kg, *i.p*) e um tubo de polietileno (PE-50) conectado a um cateter (PE-10) (Clay Adams, EUA), previamente preenchido com solução salina heparinizada (40 U mL⁻¹), foi inserido na artéria femoral e exteriorizado na parte de trás do pescoço do animal. Aproximadamente após 9 horas de recuperação, a PAS, pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca foram avaliadas, nos animais acordados e em livre movimento, com auxílio de um transdutor de pressão (model PT300; Grass Instruments Div., Warwick, NY, USA), acoplado a um sistema de aquisição de dados (Biopac System - MP100; Santa Barbara, CA, USA).

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Uma vez confirmada a normalidade dos dados, foi utilizado um teste de Grubbs (*two side Grubbs' test*) para identificar possíveis *outlier*. Quando, pelo menos, havia um *outlier* identificado, o método ROUT adaptado para detectar quaisquer *outliers* foi usado com configuração para Q de 1 % (alfa = 0,01). As comparações de reatividade vascular e PAS foram feitas por meio da análise de variância de duas vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. AUC, resposta máxima (R_{max}) e intensidade de fluorescência foram avaliados por meio da análise de variância de uma via (*one-way ANOVA*), seguida pelo teste *post*

hoc de Tukey, ou *Student t test* quando apropriado. Os parâmetros histomorfométricos não seguiram distribuição gaussiana e por tanto foram analisados pelo teste de Mann-Whitney. O nível de significância foi estabelecido como $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 DADOS PONDERAIS

A tabela 1 apresenta os dados de peso dos animais estudados. Como pode ser observado, os grupos ORX-30d e ORX-75d apresentaram menor peso corporal quando comparados aos seus respectivos controles. Como esperado, a gonadectomia promoveu atrofia dos órgãos acessórios do sistema reprodutor masculino, próstata e vesícula seminal em todos os grupos, o que indica a efetividade do modelo de deficiência dos hormônios sexuais masculinos. Também pôde ser observado que a gonadectomia não alterou o peso das câmaras cardíacas e do músculo gastrocnêmio.

4.2 REATIVIDADE VASCULAR

Os dados de reatividade vascular de artéria mesentérica de terceira ordem mostraram prejuízo no relaxamento concentração-resposta à ACh, no grupo Sham-75d quando comparado aos outros grupos Sham (Figura 8A). Este prejuízo foi confirmado pelos dados da área abaixo da curva (Sham-15d, 238 ± 14 ; Sham-30d, 232 ± 19 ; Sham-60d, 215 ± 20 , e Sham-75d, 153 ± 22 u.a.) e pelos dados de relaxamento máximo (Sham-15d, 94 ± 2 ; Sham-30d, 97 ± 2 ; Sham-60d, 87 ± 3 ; Sham-75d, 67 ± 8 %) (Figuras 8B e 8C, respectivamente). Por outro lado, os animais orquiectomizados não tiveram alteração na resposta de relaxamento nos grupos estudados (Figuras 8D, 8E e 8F).

Tabela 1 - Dados ponderais de ratos Wistar dos grupos Sham e orquiectomizados (ORX) pós 15, 30, 60, e 75 de cirurgia.

Grupos		15d		30d		60d		75d					
		n	EPM	N	EPM	n	EPM	n	EPM				
Corpóreo (g)	Sham	10	295	10	10	356	12	10	399	9	9	456	11
	ORX	10	274	12	10	313*	7	9	384	10	9	407*	7
Próstata (mg/mm)	Sham	10	9	0,7	10	12,9	0,8	10	13,3	0,8	9	17,5	1,4
	ORX	10	0,7*	0,1	10	0,6*	0,1	9	0,5*	0,1	9	0,5*	0,1
Vesícula Seminal (mg/mm)	Sham	10	11,4	0,8	10	12,3	0,9	10	14,7	0,7	9	16,4	0,6
	ORX	10	1,7*	0,1	10	1,2*	0,1	9	1,2*	0,1	9	1*	0,1
Ventrículo esquerdo (mg/mm)	Sham	10	3,8	0,1	10	3,8	0,2	10	4,4	0,1	9	4,3	0,1
	ORX	10	3,4	0,1	10	3,6	0,1	9	4,1	0,1	9	3,9	0,1
Ventrículo direito (mg/mm)	Sham	10	1,2	0,04	10	1	0,05	10	1,3	0,02	9	1,2	0,03
	ORX	10	1	0,04	10	1	0,04	9	1,2	0,04	9	1,1	0,04
Gastrocnêmio (mg/mm)	Sham	10	41	2	10	50	2	10	56	1	9	59	1
	ORX	10	41	1	10	47	2	9	56	1	9	61	1

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Na tabela são apresentados dados relativos, de modo que o peso em miligramas (mg) dos órgãos, foi corrigido pelo comprimento da tibia, em milímetro (mm). A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo *Tukey's Post Hoc test*. * $p < 0,05$ comparado com animais Sham do mesmo grupo.

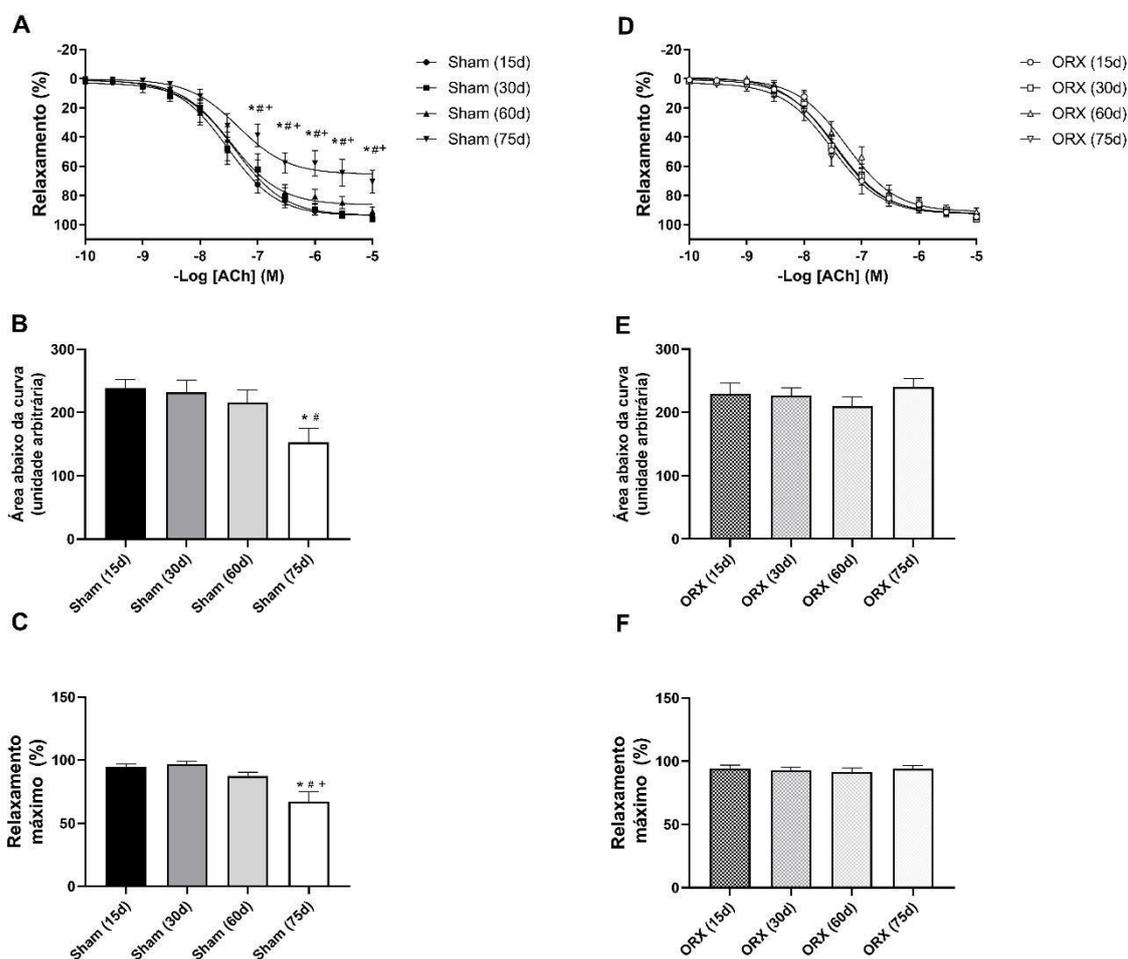


Figura 8 - Reatividade vascular à acetilcolina (ACh, 10^{-10} M - 10^{-5} M) em artéria mesentérica de terceira ordem de ratos Wistar Sham e orquiectomizados (ORX). (A e D) curva concentração-resposta à ACh, (B e E) área abaixo da curva e (C e F) resposta máxima de relaxamento dos grupos Sham e ORX após 15, 30, 60 e 75 dias de cirurgia. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo *Bonferroni post hoc test*. * $p < 0,05$ comparado com grupo Sham-15d, # $p < 0,05$ comparado com Sham-30d e * $p < 0,05$ comparado Sham-60d. $n = 7$ para cada grupo.

Tendo em vista que o grupo Sham-75d apresentou prejuízo na resposta vasodilatadora dependente do endotélio, em comparação com os demais grupos Sham, bem como em comparação com os grupos ORX (apêndice A), realizamos protocolos para avaliação dos mediadores endoteliais envolvidos no relaxamento vascular dos grupos Sham e ORX após 15 e 75 dias de cirurgia (a avaliação dos demais grupos pode ser vista no apêndice B). Assim, foram realizadas incubações com inibidores inespecíficos da COX e NOS. Como pode ser observado na figura

9, a resposta vasodilatadora dependente do endotélio nas artérias estudadas parece ser independente da via de formação de prostanoídes (Figuras 9A e 9D) e dependente da via de formação do NO (Figuras 9B e 9E) nos grupos Sham [Sham-15d (238 ± 14 para 26 ± 5 u.a.) e Sham-75d (153 ± 22 para 31 ± 9 u.a.)]. Ainda, a inibição combinada da COX e NOS (Figuras 9C e 9F) confirmou a participação do NO na resposta vasodilatadora [Sham-15d (238 ± 14 para 39 ± 12 u.a.) e Sham-75d (153 ± 22 para 46 ± 21 u.a.)].

A figura 10 nos mostra que os animais orquiectomizados, não apresentaram alterações no padrão de resposta, no que se refere a importância dos mediadores endoteliais na vasodilatação estimulada pela ACh quando comparados aos grupos Sham. Como pode ser observado, a resposta vasodilatadora parece ser independente da via de formação dos prostanoídes (Figuras 10A e 10D) e dependente da via de formação do NO (Figuras 10B e 10E - ORX-15d, de 229 ± 16 para 42 ± 7 ; ORX-75d, de 240 ± 13 para 30 ± 11 u.a.) (Figuras 10C e 10F - ORX-15d, de 229 ± 16 para 55 ± 15 ; ORX-75d, de 240 ± 13 para 25 ± 7 u.a.). As figuras 9G e 10G, resumem a participação dos mediadores endoteliais estudados evidenciando menor participação do NO no grupo Sham-75d.

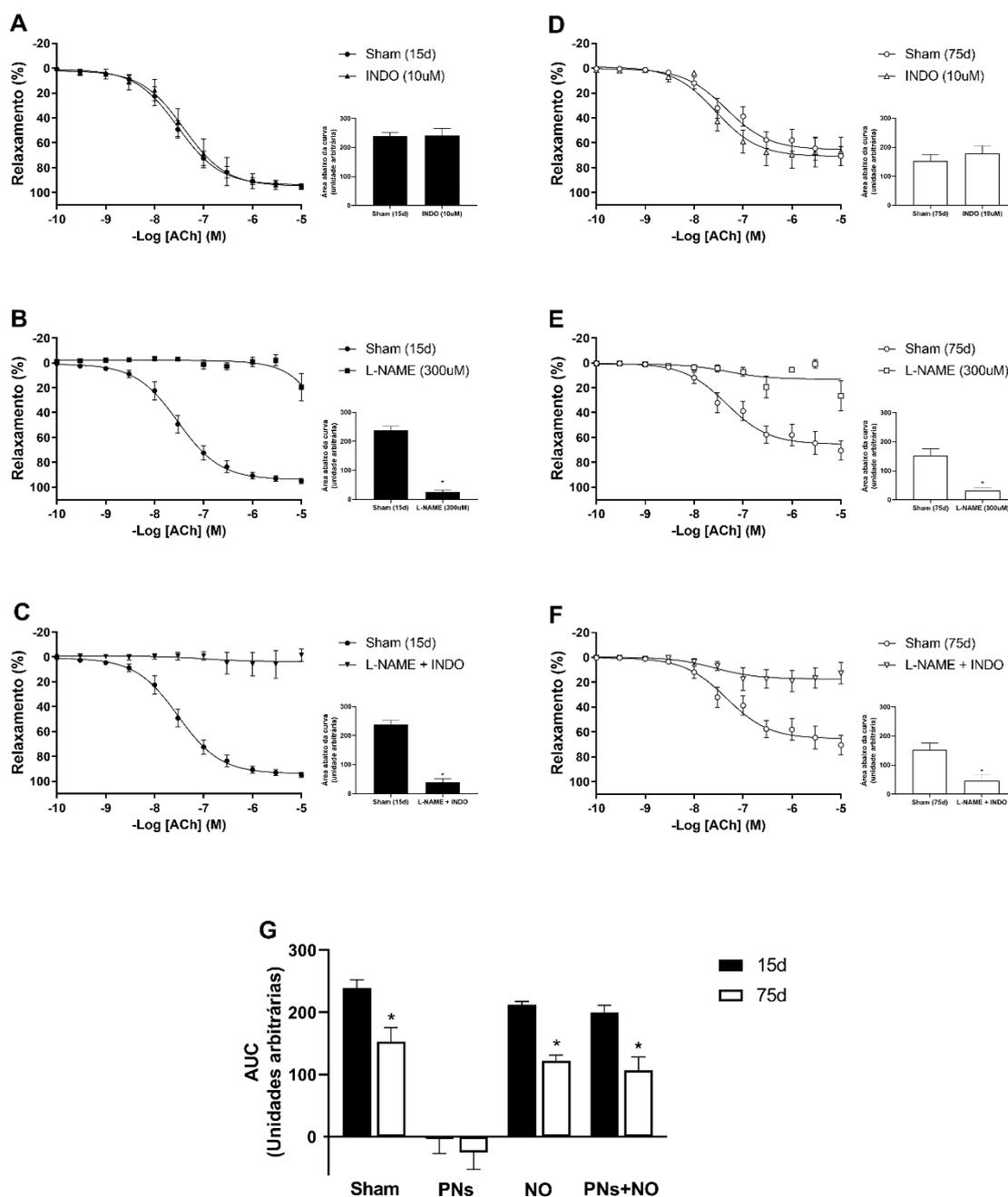


Figura 9 - Participação dos mediadores endoteliais na curva concentração-resposta à acetilcolina (ACh, 10^{-10} M - 10^{-5} M) em artéria mesentérica de terceira ordem de ratos Sham após 15 e 75 dias de cirurgia. (A e D) Efeito da inibição da ciclooxigenase (COX) com indometacina (INDO, 10 μ M), n=7 para grupo 15d e n=6 para grupo 75d, (B e E) inibição da óxido nítrico sintase (NOS) com N^w-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 300 μ M), n=7 para grupo 15d e n=6 para grupo 75d, (C e F) inibição combinada da NOS e COX com L-NAME + INDO, n=7 para grupo 15d e n=6 para grupo 75d e (G) contribuição dos prostanoides (PNs), óxido nítrico (NO) e PNs + NO. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo *Bonferroni post hoc test*. *p<0,05 comparado com seu respectivo grupo Sham.

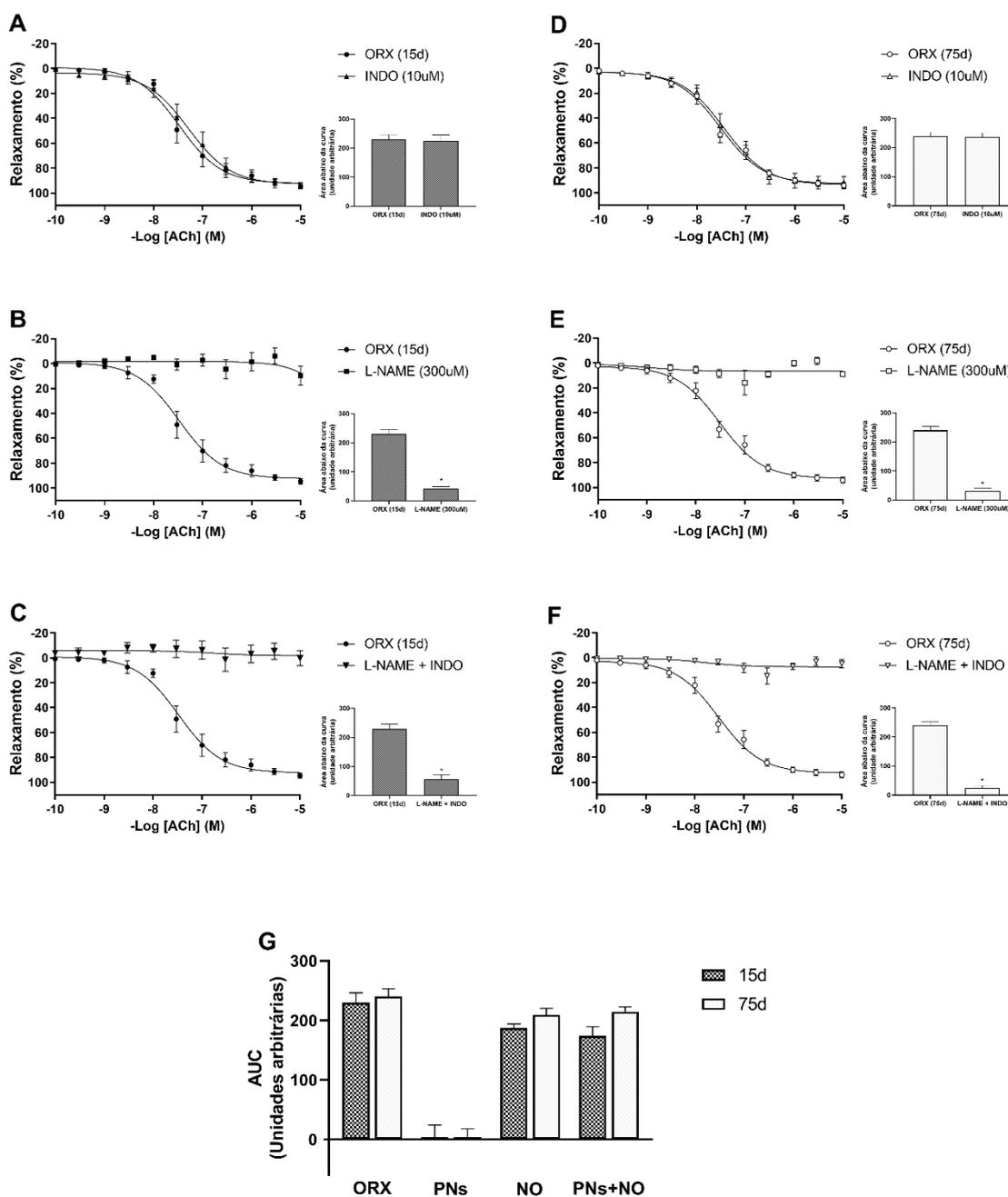


Figura 10 - Participação dos mediadores endoteliais na curva concentração-resposta à acetilcolina (ACh, 10^{-10} M - 10^{-5} M) em artéria mesentérica de terceira ordem de ratos orquiectomizados (ORX) após 15 e 75 dias de cirurgia. (A e D) Efeito da inibição da ciclooxigenase (COX) com indometacina (INDO, 10 μ M), n=8 para cada grupo, (B e E) efeito da inibição da óxido nítrico sintase (NOS) com N^ω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 300 μ M), n=7 para grupo 15d e n=8 para grupo 75d, (C e F) inibição combinada da NOS e COX com L-NAME + INDO, n=8 para grupo 15d e n=7 para grupo 75d e (G) contribuição dos prostanoídes (PNs), óxido nítrico (NO) e PNs + NO. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo *Bonferroni post hoc test*. *p<0,05 comparado com seu respectivo grupo ORX.

Além da resposta vasodilatadora mediada pelo endotélio, também foi avaliada a capacidade contrátil das artérias mesentérica de terceira ordem em resposta a um agonista α_1 -adrenérgico, fenilefrina (PE) (Figura 11). Assim, foi observado que os grupos Sham-60d e Sham-75d tiveram maior resposta contrátil (Figura 11A) em comparação aos demais grupos Sham. Esses resultados foram confirmados pelos dados de área abaixo da curva dos grupos Sham-60d (40 ± 1 u.a.) e Sham-75d (37 ± 1 u.a.), quando comparado aos grupos Sham-15d (28 ± 1 u.a.) e Sham-30d (29 ± 1 u.a.). Além disso, o grupo Sham-75d apresentou resposta de contração máxima (19 ± 1 mN) maior quando comparado aos demais grupos Sham. No entanto, de forma interessante, nos grupos orquiectomizados não houve o aumento da contração induzida pela PE nos animais mais velhos (ORX-60d e ORX75d) como observado nos animais Sham (Figuras 11D, 11E e 11F). O grupo ORX-75d apresentou área abaixo da curva e resposta de contração máxima menores quando comparado ao grupo Sham-75d (apêndice C).

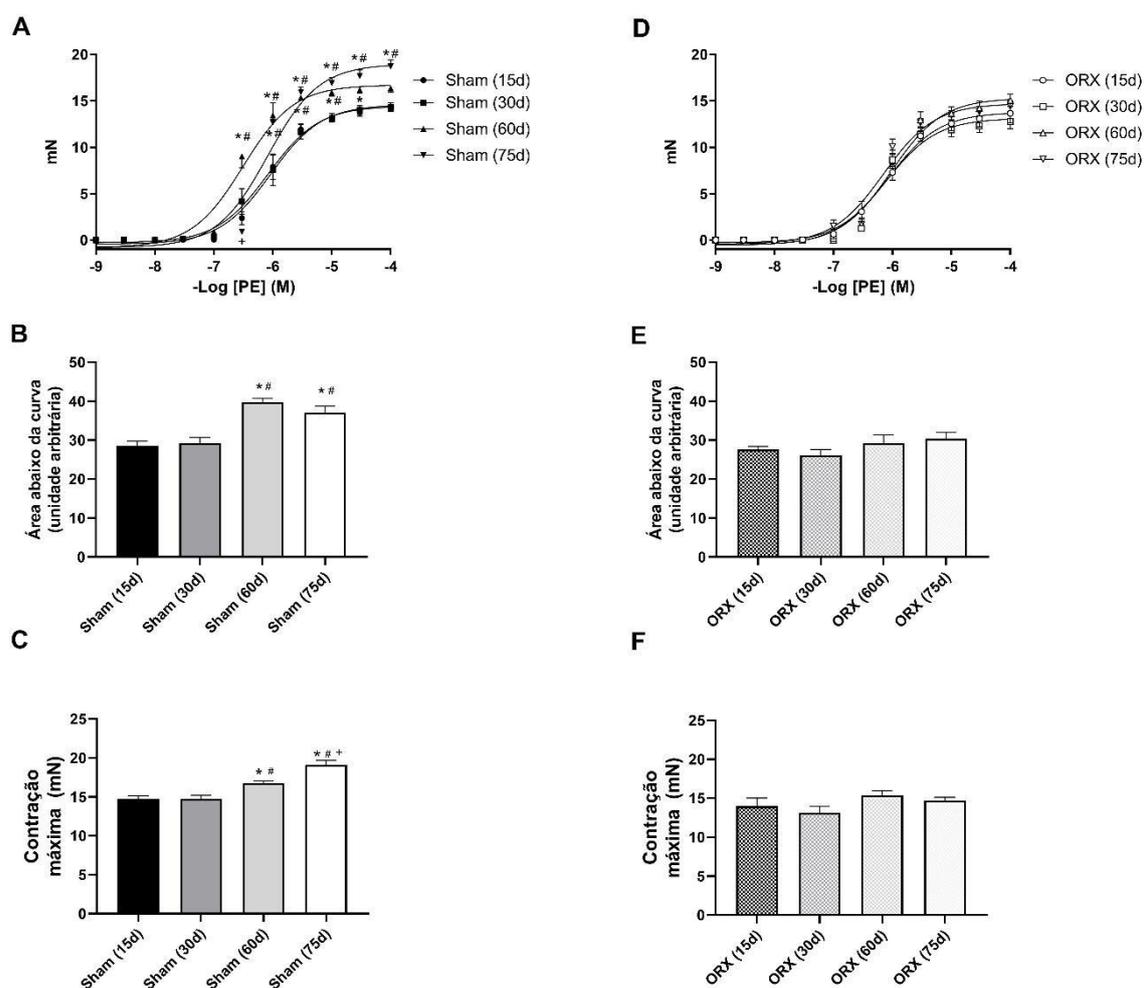


Figura 11 - Reatividade vascular à fenilefrina (PE, 10^{-9} M - 10^{-4} M) em art6ria mesent6rica de terceira ordem de ratos Wistar Sham e orquiectomizados (ORX). (A e D) curva concentraç3o-resposta à PE, (B e E) 3rea abaixo da curva e (C e F) resposta m3xima de contraç3o dos grupos Sham ($n=6$ para cada grupo) e ORX ($n=6-7$ para cada grupo) ap3s 15, 30, 60 e 75 dias de cirurgia. Os valores foram expressos como m3dia \pm erro padr3o da m3dia (EPM). A an3lise estatística foi realizada por meio da an3lise de vari3ncia de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo *Bonferroni post hoc* test. * $p<0,05$ comparado com grupo Sham-15d, # $p<0,05$ comparado com Sham-30d e + $p<0,05$ comparado Sham-60d.

4.3. AN3LISE MORFOL3GICA

Os dados da an3lise morfol3gica das art6rias mesent6ricas de terceira ordem podem ser vistos na figura 12, onde s3o mostradas imagens representativas das art6rias mesent6ricas dos grupos Sham-15d (Figuras 12A e 12A¹) e Sham-75d (Figuras 12B e 12B¹) e marcaç3o com *Picrosirius red* dos grupos Sham-15d (Figura 12C) e Sham-75d (Figura 12D). O grupo Sham-75d apresentou aumento do l3men

($9,55 \pm 0,43 \mu\text{m}^2$) (Figura 12E) em comparação com o grupo Sham-15d ($7,69 \pm 0,43 \mu\text{m}^2$). Além disso, a espessura da parede da artéria mesentérica (túnica média, Figura 12F) foi menor no grupo Sham-75d ($21,52 \pm 0,83 \mu\text{m}$) em comparação com o grupo Sham-15d ($27,18 \pm 1,15 \mu\text{m}$). A deposição de colágeno (Figura 12G) foi menor no grupo Sham-75d ($37,36 \pm 0,62 \%$) quando comparado ao grupo Sham-15d ($32,01 \pm 1,24 \%$).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das artérias mesentéricas de terceira ordem de ratos machos (Figure 13) revelou que a superfície endotelial do grupo Sham-15d apresentou aparência escamosa normal e aparência regular do núcleo das células (Figura. 13A e 13A¹). No grupo Sham-75d, foi observado epitélio escamoso anormal, sugerindo aspecto de dano endotelial (asterisco), levando a uma superfície endotelial irregular com acúmulo de células sanguíneas e aspecto contraído (Fig. 13B e 13B¹).

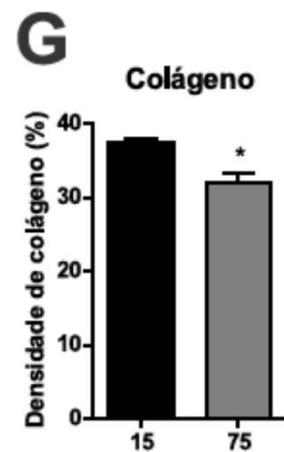
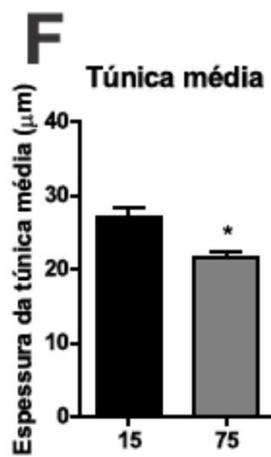
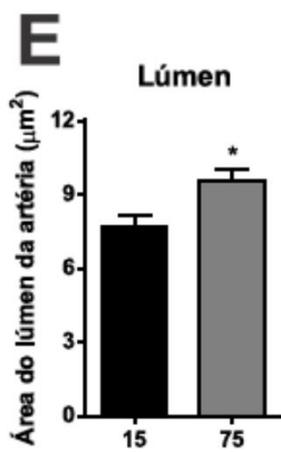
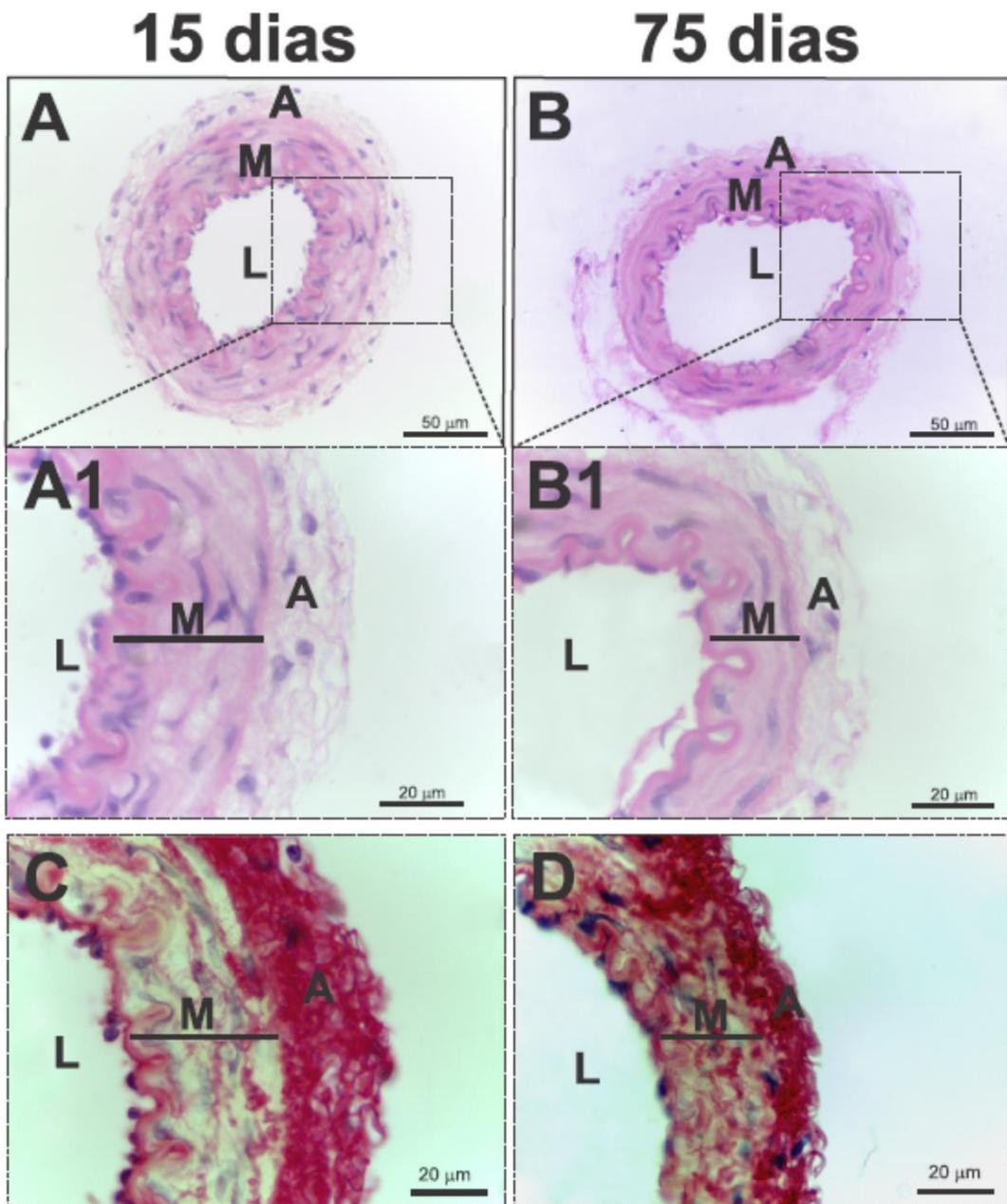


Figura 12 - Imagem histomorfométrica de coloração por Hematoxilina-Eosina (H&E) ou por *Picrosirius red* em artéria mesentérica de terceira ordem de ratos Sham pós 15 e 75 dias de cirurgia. Camadas média (M), adventícia (A) e lúmen (L) em: (A e A1) secções histológicas de artéria mesentérica de terceira ordem do grupo Sham-15d mostrando aparente morfologia normal do vaso e (B e B1) Secções histológicas de artéria mesentérica de terceira ordem do grupo Sham-75d com aparente sinais de atrofia da musculatura lisa vascular. Imagem representativa da densidade de colágeno no grupo (C) Sham-15d e (D) Sham-75d. Área do lúmen vascular (E), espessura de parede da musculatura lisas vascular (F) e densidade de colágeno (G) nos grupos Sham-15 e 75d. Barra de escala = 50 μ m e 20 μ m. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada por meio do teste de *Mann-Whitney*. * $p < 0,05$ comparado com grupo Sham-15d. n=4 para cada grupo. n=4 para cada grupo.

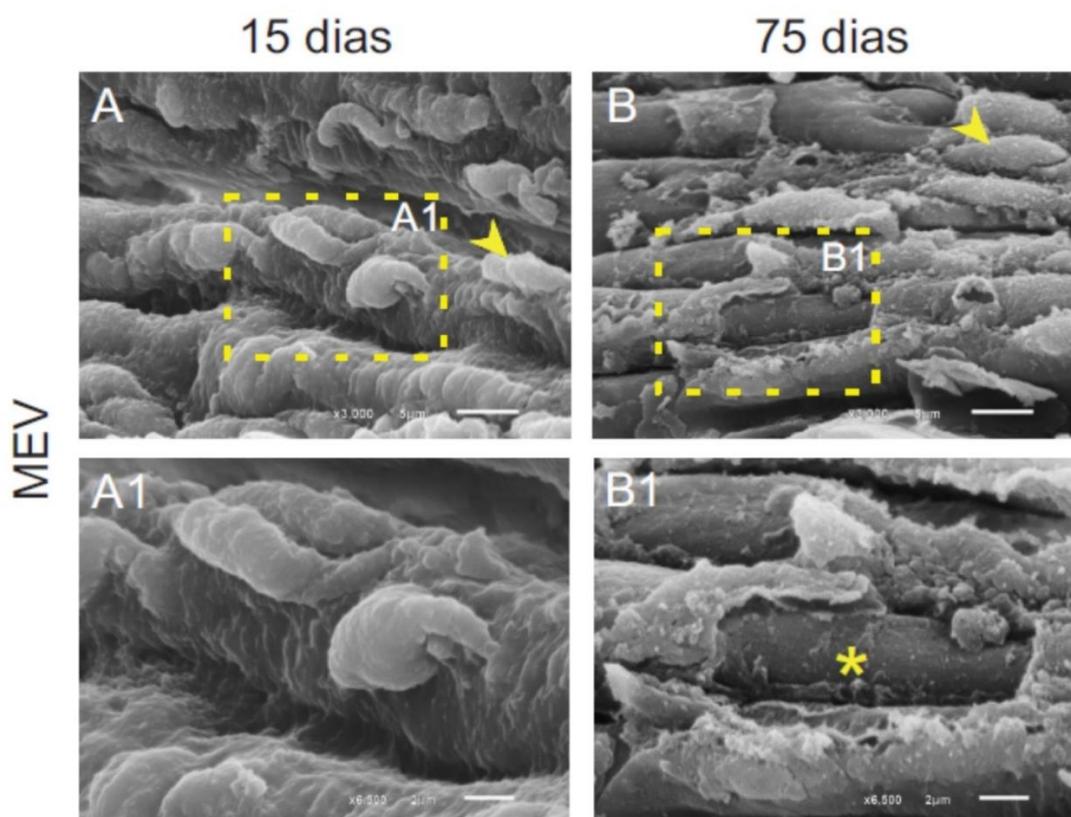


Figura 13 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando a superfície endotelial de artérias mesentéricas de terceira ordem de ratos Sham após 15 e 75 dias de cirurgia. (A e A1) Células endoteliais das artérias mesentéricas de terceira ordem do grupo Sham-15d de aparência escamosa normal mostrando aparência regular da célula epitelial nucleada (seta). (B e B1) Superfície endotelial das artérias mesentéricas de terceira ordem do grupo Sham-75d com superfície irregular, sugerindo dano superficial das células endoteliais com acúmulo de células sanguíneas e aspecto contraído (asterisco). Barra de escala = 5 μ m e 2 μ m. n=4 para cada grupo.

4.4. ANÁLISE DOS NÍVEIS DE FLUORESCÊNCIA DO NO, O₂^{•-} E H₂O₂

Os dados de fluorescência revelam que, em condições basais, a intensidade de oxidação do DAF-2DA pelo NO, representada pela cor verde (Figura 14), foi menor em artérias mesentéricas de terceira ordem do grupo Sham-75d ($1,4 \pm 0,03$ u.a.) quando comparado ao grupo Sham-15d ($2,2 \pm 0,06$ u.a.).

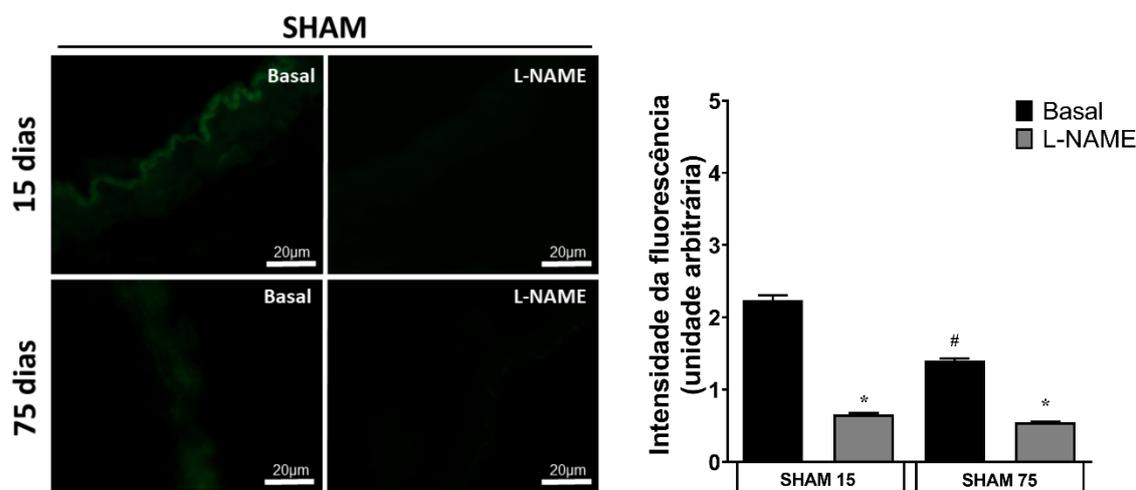


Figura 14 - Análise da microscopia de fluorescência emitida pelo DAF-2DA em artérias mesentéricas de terceira ordem de ratos Wistar Sham após 15 e 75 dias de cirurgia. Os protocolos foram realizados na ausência ou na presença de inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (L-NAME, 300 µM) com quantificação da fluorescência produzida. Barra de escala = 20 µm. Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (two-way ANOVA) seguida pelo *Tukey's post hoc test*. * $p < 0,05$ comparado com mesmo grupo sob condições basais e # $p < 0,05$ comparado com seu respectivo grupo 15d. $n = 4$ para cada grupo.

A intensidade de fluorescência emitida da oxidação do DHE pelo O₂^{•-} (Figure 15), revelou que as artérias mesentéricas de terceira ordem do grupo Sham-75d ($2,7 \pm 0,1$ u.a.) apresentam maior intensidade de fluorescência (representado pela cor vermelha) quando comparadas aos grupos Sham-15d ($2,2 \pm 0,04$ u.a.).

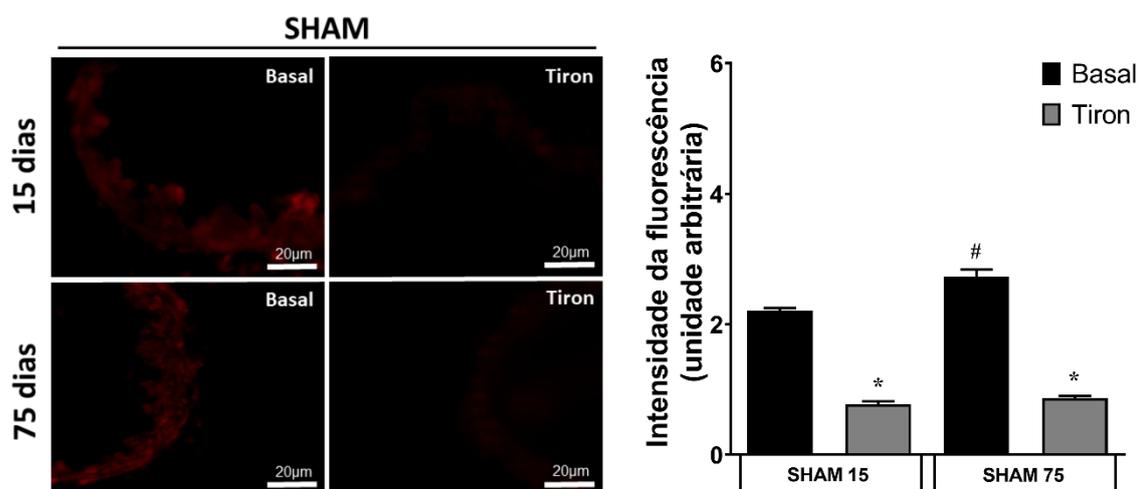


Figura 15 - Análise da microscopia de fluorescência emitida pelo DHE em artérias mesentéricas de terceira ordem de ratos Wistar Sham após 15 e 75 dias de cirurgia. Os protocolos foram realizados na ausência ou na presença de *scavenger* (varredor/eliminador) de $O^{2\bullet}$ (Tiron, 10 μ M) com quantificação da fluorescência produzida. Barra de escala = 20 μ m. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo *Tukey's post hoc test*. * $p < 0,05$ comparado com mesmo grupo sob condições basais e # $p < 0,05$ comparado com seu respectivo grupo 15d. $n=4$ para cada grupo.

A intensidade de fluorescência emitida da oxidação do DCF pelo H_2O_2 (Figure 16) revelou que as artérias mesentéricas de terceira ordem do grupo Sham-75d ($2,7 \pm 0,06$ u.a.) emitiram menor intensidade de fluorescência (representado pela cor verde) quando comparadas ao grupo Sham-15d ($3,4 \pm 0,1$ u.a.).

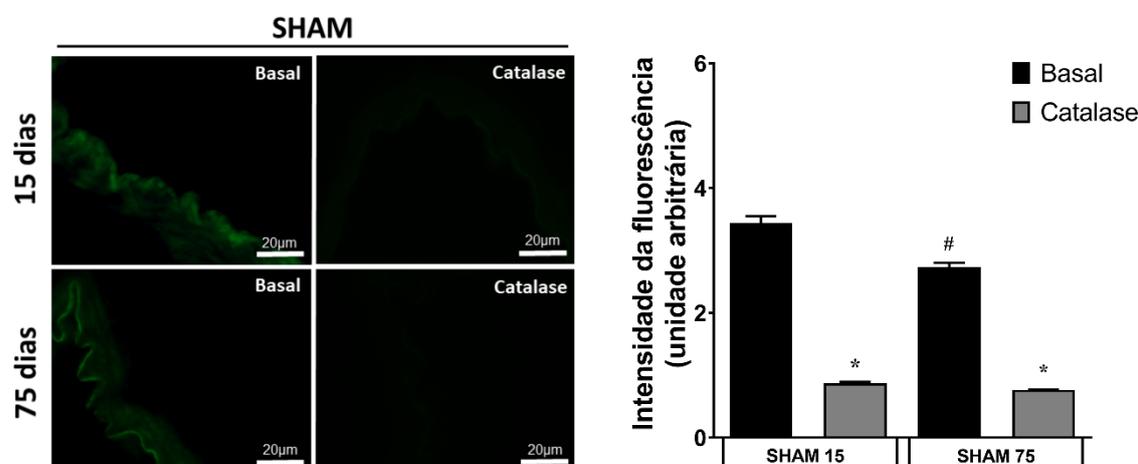


Figura 16 - Análise da microscopia de fluorescência emitida pelo H2DCF-DA em artérias mesentéricas de terceira ordem de ratos Wistar Sham após 15 e 75 dias de cirurgia. Os protocolos foram realizados na ausência ou na presença de catalase (1000 units / mL), enzima que

degrada H_2O_2 com quantificação da fluorescência produzida. Barra de escala = 20 μm . Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo *Tukey's post hoc test*. * $p < 0,05$ comparado com mesmo grupo sob condições basais e # $p < 0,05$ comparado com seu respectivo grupo 15d. $n=4$ para cada grupo.

4.5. AVALIAÇÃO PRESSÃO ARTERIAL

A avaliação não invasiva da PAS está representada na figura 17. Como pode ser observado, não houve alterações na PAS durante o período de observação e, ao final de dez semanas os animais Sham apresentavam 127 ± 2 e ORX 126 ± 2 mmHg. Dados de medida direta da pressão arterial (Figura 18) confirmam que não houve diferença de PAS, PAD, PAM e frequência cardíaca entre os grupos Sham-75d e ORX-75d.

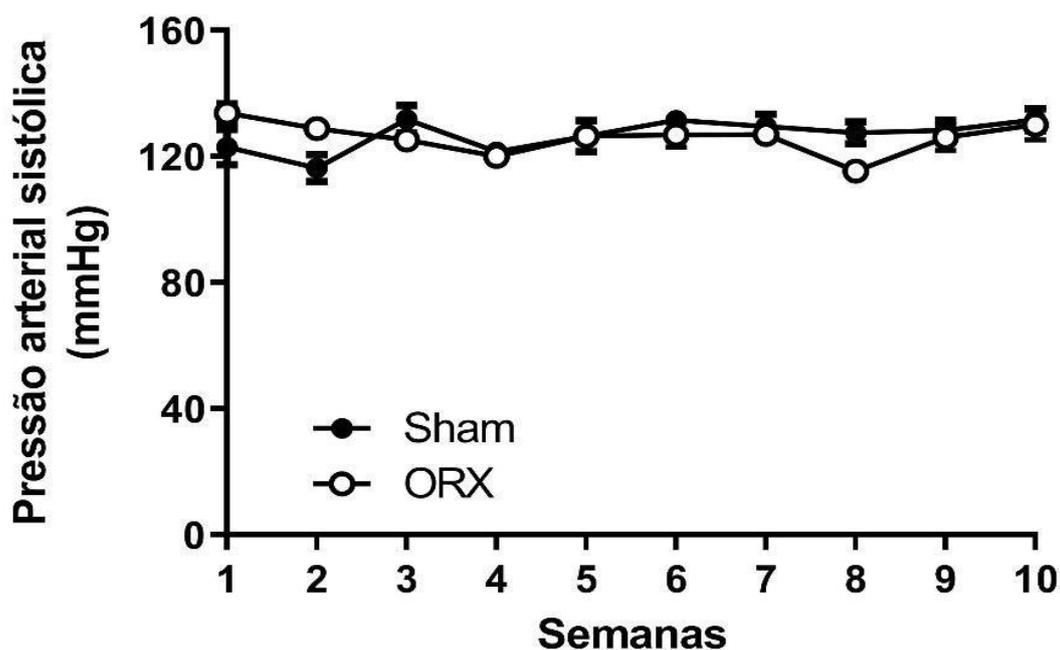


Figura 17 - Avaliação não invasiva da pressão arterial sistólica (PAS) por meio de pletismografia de cauda. PAS de ratos Sham ($n=7$) e orquiectomizados (ORX, $n=10$) ao longo de 10 semanas de observação. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo *Bonferroni post hoc test*.

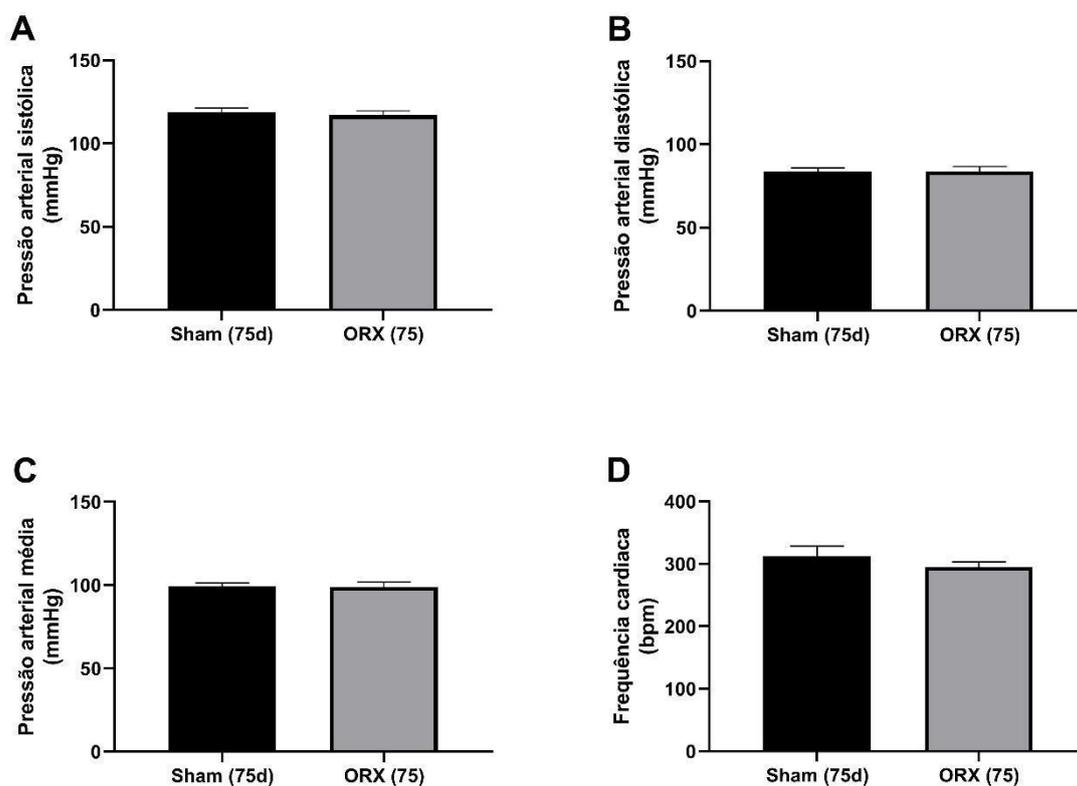


Figura 18 - Avaliação invasiva da pressão arterial por meio da cateterização da artéria femoral. (A) Pressão arterial sistólica, (B) pressão arterial diastólica (B), (C) pressão arterial média e (D) frequência cardíaca de ratos Sham e orquiecomizados (ORX) após 75 dias de cirurgia. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada por meio do *Student's t tests*. N=9 para cada grupo.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O principal achado do nosso estudo foi que os animais Sham-75d apresentaram um prejuízo na reatividade vascular em artérias mesentéricas de terceira ordem comparado aos animais Sham-15d, bem como aos animais orquiectomizados. Esta diferença foi acompanhada por alterações morfológicas e por alterações na liberação de fatores de relaxamento derivados do endotélio, principalmente NO.

Como demonstrado no presente estudo, os animais orquiectomizados apresentaram reduzido peso corporal quando comparados aos animais do grupo Sham. Sabe-se que a testosterona pode interagir com enzimas envolvidas no controle da gordura e peso corporal (BLOUIN; BOIVIN; TCHERNOF, 2008). É conhecido que a testosterona reduz atividade da enzima lipase lipoproteica (LEE; LEE; CHO, 2013), enzima responsável pela hidrólise dos triglicerídeos das lipoproteínas plasmáticas (MEAD; IRVINE; RAMJI, 2002). Nesta perspectiva, com a diminuição dos andrógenos circulantes, esta inibição da testosterona sobre a lipase lipoproteica seria reduzida, favorecendo processo de adipogênese (MEAD; IRVINE; RAMJI, 2002). Além disso, a testosterona também está envolvida no aumento da atividade da enzima lipase sensível a hormônio (XU; PERGOLA; BJORNTORP, 1990; LANGFORT *et al.*, 2010), responsável pela hidrólise dos triglicerídeos estocados nos adipócitos (JÉQUIER; TAPPY, 1999), reforçando ainda mais a hipótese da participação do andrógeno no controle do peso corporal.

A relação dos andrógenos com a modulação dos triglicerídeos plasmáticos pode ser confirmada em estudo realizado com animais normotensos e orquiectomizados, porém com redução do peso corporal (ROUVER *et al.*, 2015). Esses achados estão de acordo com os dados do presente estudo, uma vez que encontramos uma redução do peso corporal nos animais orquiectomizados. Tendo em vista que os andrógenos possuem função anabólica, aumentando a massa corporal livre de gordura (WOODWARD, 1993), avaliamos a possibilidade dos animais orquiectomizados apresentarem atrofia muscular. Contudo, durante todo tempo de avaliação proposto, os animais mantiveram o peso relativo do músculo gastrocnêmio semelhante entre os grupos estudados. A atrofia dos órgãos

acessórios do sistema reprodutor masculino, próstata e vesícula seminal, confirmou a efetividade da orquiectomia (WOODWARD, 1993; JUSTULIN *et al.*, 2006; FELIX-PATRÍCIO *et al.*, 2017).

No que se refere a reatividade vascular das artérias mesentéricas de terceira ordem, foi observado que animais do grupo Sham-75d apresentaram relaxamento dependente do endotélio reduzido quando comparados aos animais Sham-15d, bem como aos animais ORX. Esses resultados sugerem que a presença dos andrógenos poderiam modular a reatividade vascular em artérias mesentéricas, conduzindo a um prejuízo no relaxamento dependente do endotélio com decorrer da idade. Nossos dados estão de acordo com dados da literatura em que prejuízos no sistema cardiovascular, na presença dos hormônios sexuais masculinos, são atenuados pela orquiectomia (OLOYO; SOFOLA; YAKUBU, 2016; CORRÊA *et al.*, 2019).

É conhecido que os hormônios sexuais masculinos são capazes de modular parâmetros vasculares (RECKELHOFF *et al.*, 1999; SVARTBERG *et al.*, 2004; PERUSQUÍA *et al.*, 2015; PERUSQUÍA; CONTRERAS; HERRERA, 2019). Como em nosso estudo, outros autores têm mostrado que a deficiência hormonal, em machos normotensos, após quatro semanas de castração, não foi capaz de alterar a reatividade vascular em artérias mesentéricas de segunda ordem (TOOT *et al.*, 2012). O mesmo foi encontrado em estudo com artéria ilíaca interna de ratos, onde a orquiectomia, por seis semana, não alterou a reatividade vascular quando comparado aos animais controle (OLOYO; SOFOLA; YAKUBU, 2016). Por outro lado, a deficiência na produção de andrógenos foi capaz de prejudicar tanto o relaxamento vascular de artérias pudendas internas, após quatro semanas de orquiectomia (ALVES-LOPES *et al.*, 2017), quanto o relaxamento vascular do leito coronariano de ratos normotensos após 15 dias de castração (ROUVER *et al.*, 2015). Sabe-se também que em segmento de aorta torácica de ratos, após quatro semana de castração, houve melhora na resposta vasodilatadora dependente do endotélio (FERRER *et al.*, 1999).

Essas diferenças em relação a participação dos andrógenos nos diferentes estudos evidenciam a complexidade das ações dos hormônios sexuais masculinos no

sistema vascular. Em nosso estudo, os animais orquiectomizados não apresentaram alterações nos parâmetros de reatividade vascular, contudo os animais Sham-75d apresentaram prejuízo na função vascular. Sabe-se que os níveis de testosterona, de ratos Wistar, tendem a um aumento progressivo nas primeiras semanas de vida chegando em torno de $0,492 \pm 0,069$ ng/mL no sétimo dia e alcançam seu pico após dois meses de vida, atingindo cerca de $2,32 \pm 0,126$ ng/mL (SILVA *et al.*, 2013). Com o avançar da idade, os níveis de testosterona tendem a uma redução gradativa, com início do declínio por volta do sétimo mês de vida, chegando a 90 % de redução por volta do 18^o mês (DALMASSO *et al.*, 2017). Desta forma, nossa sugestão é que a presença de hormônios esteroides masculinos, associados à progressão da idade possa ter contribuído para o prejuízo à reatividade vascular encontrado neste estudo, tendo em vista que os animais ORX não tiveram alteração nos parâmetros vasculares.

Além do prejuízo no relaxamento dependente do endotélio, os animais Sham-75d tiveram um aumento da resposta contrátil estimulada por um agonista α_1 -adrenérgico. O mesmo prejuízo não foi observado nos animais orquiectomizados. Em estudo com artérias coronárias de ratos Wistar jovens (3–4 meses de idade) e idosos (22–26 meses de idade), vasos coronarianos de animais idosos eram menos sensíveis aos efeitos vasodilatadores da testosterona em comparação aos vasos de animais jovens e essa redução do relaxamento vascular foi acompanhada por hipertrofia das células do músculo liso vascular com espessamento da túnica média (ENGLISH *et al.*, 2000). Diante disso, nosso intuito foi verificar se os animais Sham-75d apresentavam tais alterações morfológicas nas artérias mesentéricas de terceira ordem. Para tanto, foi realizada avaliação histomorfométrica dos animais Sham, tendo em vista que esse grupo apresentou alterações na reatividade vascular. Como resultados, constatamos que nossos animais Sham-75d estavam com a parede da musculatura lisa vascular menor quando comparados aos animais Sham-15d.

É conhecido que o envelhecimento promove enrijecimento e espessamento da parede vascular (OSKUI *et al.*, 2013; LACOLLEY; REGNAULT; AVOLIO, 2018; MUKHERJEE *et al.*, 2020) e que há uma relação inversa entre os níveis de testosterona e espessamento da parede vascular, de modo que o declínio dos níveis

dos andrógenos, com passar da idade, se correlaciona com aumento da parede vascular, em humanos (VAN DEN BELD *et al.*, 2003; FUKUI *et al.*, 2007; FU; GAO; SHEN, 2008; MUKHERJEE *et al.*, 2020). No que se refere aos roedores, sabe-se que para os ratos de laboratório, aproximadamente 14 dias são equivalentes a 1 anos de vida humana (QUINN, 2005), de modo uma pessoa de 18 anos seria equivalente a um rato de 6 meses (SENGUPTA, 2013). Nessa perspectiva, como nossos animais com maior tempo observação estavam com 4,5 meses (Sham-75d) de idade ao final do período de acompanhamento, eles eram considerados jovens com a fase reprodutora estabelecida (QUINN, 2005; SENGUPTA, 2013). Dessa forma, acreditamos que nossos resultados de morfologia vascular podem ter ocorrido devido à idade dos animais estudados, uma vez que nossos animais ainda eram jovens e estavam com idade de pico da concentração de andrógenos (SILVA *et al.*, 2013). Estudos voltados para a análise dos efeitos da senescência da parede vascular são realizados com animais por volta dos 2 anos de vida (ENGLISH *et al.*, 2000; UNGVARI *et al.*, 2007; CSISZAR *et al.*, 2002, 2014; DALMASSO *et al.*, 2017). Contudo, mesmo com menor parede de musculatura lisa vascular, os animais Sham-75d apresentaram maiores respostas contráteis.

Dados de microscopia eletrônica de varredura revelaram uma anormalidade na aparência do tecido endotelial nos animais Sham-75d sugerindo aspecto de lesão da superfície endotelial das artérias mesentéricas de terceira ordem, levando a uma superfície endotelial irregular. Esse resultado pode nos ajudar a entender melhor o prejuízo na função vascular encontrado nesses animais. Sabe-se que o avançar da idade se correlaciona com uma progressiva disfuncionalidade endotelial (HATAKE *et al.*, 1990; EGASHIRA *et al.*, 1993; TADDEI *et al.*, 1995; SINGH *et al.*, 2002; HIGASHI *et al.*, 2006; DELP *et al.*, 2008; PIERCE; LARocca, 2008). Ademais, é conhecido que em preparações para estudo da função endotelial, onde o endotélio é preservado, o estímulo vasoconstritor fica reduzido em comparação a preparações sem endotélio (SAKATA *et al.*, 1989). Uma possível explicação para esse efeito envolve à passagem dos íons cálcio (Ca^{2+}) através das células do músculo liso vascular para as células endoteliais (DORA; DOYLE; DULING, 1997). Após estímulo vasoconstritor (por exemplo por agonista α_1 -adrenérgico), há entrada do Ca^{2+} do meio extracelular para o citoplasma das fibras musculares lisas, que via junções comunicantes alcançaria as células endoteliais adjacentes, conduzindo a

formação de fatores de relaxamento derivado do endotélio, como por exemplo: NO (DORA; DOYLE; DULING, 1997). Sendo assim, em artérias com o endotélio comprometido, a estimulação da produção de fatores de relaxamento, dependente do influxo Ca^{2+} para o citoplasma da célula endotelial (KUDO; MURAKAMI, 2002; SESSA, 2005; FÉLÉTOU; KÖHLER; VANHOUTTE, 2012), não ocorreria via junção mioendotelial, não se contrapondo assim à estimulação contrátil sobre o músculo liso vascular (DORA; DOYLE; DULING, 1997). Desta forma, é possível que nossos animais Sham-75d, por terem um endotélio irregular, sejam capazes de responder mais a um efeito contrátil como o usado neste estudo.

Considerando que os animais Sham-75d apresentaram uma superfície endotelial irregular, maior efeito contrátil e prejuízo no relaxamento dependente do endotélio, nosso próximo passo foi avaliar o envolvimento dos mediadores endoteliais nesse prejuízo. Para saber se as diferenças na reatividade vascular dependente do endotélio das artérias mesentéricas de terceira ordem foram provenientes de alterações na produção/liberação de fatores endoteliais, curvas concentração resposta à ACh foram construídas na presença de inibidores da via de formação de NO e prostanoídes. Como resultado, obtivemos que o relaxamento proveniente da via de formação do NO em animais Sham-75d estava diminuído em comparação aos animais Sham-15d, bem como dos animais ORX. É conhecido que o processo de envelhecimento é acompanhado pelo desenvolvimento da disfunção endotelial (YILDIZ, 2007). Sabe-se ainda que esta disfunção pode ocorrer quando há um desbalanço na produção de mediadores endoteliais, de modo que a biodisponibilidade de fatores de relaxamento fica reduzida, enquanto agentes vasoconstritores tem sua ação potencializada (FURCHGOTT; VANHOUTTE, 1989; STANKEVICIUS *et al.*, 2003; QIAO; MCCONNELL; KHALIL, 2008; FÉLÉTOU; KÖHLER; VANHOUTTE, 2012). Contudo, diante dos dados deste estudo, nota-se que alterações da função endotelial, que são observadas em animais idosos, também podem ser vistas em animais jovens, que já apresentam alterações estruturais do tecido vascular.

Além das alterações estruturais, nossos dados de fluorescência revelaram que os animais Sham-75d apresentaram uma diminuição nos níveis de NO comparados aos animais Sham-15d. Uma possível explicação para nossos resultados, em

relação a diminuição da resposta à ACh em animais Sham-75d, pode estar relacionada com a redução da biodisponibilidade do NO, decorrente da produção dos andrógenos em função da idade. O declínio da função endotelial com a progressão da idade e consequente diminuição gradativa dos mediadores vasodilatadores do endotélio, tal como do NO, já foi demonstrado em modelos experimentais, entretanto utilizando roedores com 24 meses de vida (YILDIZ, 2007; DELP *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2009). Os dados de nosso estudo curiosamente mostraram que esse prejuízo na biodisponibilidade do NO já começa a ser notado em animais jovens, com apenas 4,5 meses de vida.

Um outro fator que poderia estar envolvido na diminuição da biodisponibilidade do NO pode envolver a produção dos hormônios sexuais masculinos. Um estudo realizado em regiões cerebrais, mostrou que a deficiência hormonal, em ratos machos, foi capaz de promover aumento da atividade da NOS sinalizando uma relação negativa entre concentração de andrógenos e produção de NO (SINGH *et al.*, 2000).

É bem conhecido que os andrógenos podem induzir a formação de espécies reativas de oxigênio, a exemplo do $O_2^{\bullet-}$. (TOSTES *et al.*, 2016; CRUZ-TOPETE; DOMINIC; STOKES, 2020). Por exemplo, os andrógenos, são capazes de aumentar níveis plasmáticos de mRNA tanto para angiotensinogênio quanto para renina (ELLISON *et al.*, 1989; CHEN; NAFTILAN; OPARIL, 1992), além de estimular atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) (HERINGER *et al.*, 2016), todos componentes importantes do sistema renina angiotensina aldosterona que contribuem para a formação de $O_2^{\bullet-}$ (BATALLER *et al.*, 2003; PAIK *et al.*, 2014). A testosterona, por sua vez, é capaz de estimular a atividade do complexo NADPH oxidase (CHIGNALIA *et al.*, 2012), assim como seus metabólitos (TOSTES *et al.*, 2016), aumentando a produção de $O_2^{\bullet-}$ (RODIÑO-JANEIRO *et al.*, 2013). Ademais, a testosterona também é capaz de aumentar a expressão da subunidade NOX4 da NADPH oxidase no músculo liso vascular de ratos normotensos (CHIGNALIA *et al.*, 2012), subunidade essa descrita no sistema vascular (PAIK *et al.*, 2014).

Uma vez formado, o $O_2^{\bullet-}$ pode agir diretamente como vasoconstritor aumentando a sensibilidade ao íon cálcio que subsequentemente conduz a constrição arterial

(KNOCK *et al.*, 2009). O $O_2^{\bullet-}$ ainda pode indiretamente modular a reatividade vascular diminuindo a biodisponibilidade do NO por meio da formação de $ONOO^-$, produto da reação do $O_2^{\bullet-}$ com NO (ZOU; SHI; COHEN, 2002). O $ONOO^-$, por sua vez, pode interferir negativamente na produção de substratos requeridos para formação de NO (como por exemplo (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin - BH_4), que consequentemente resulta no aumento da síntese de $O_2^{\bullet-}$ ao invés do NO, pela NOS (LAURSEN *et al.*, 2001; SATOH *et al.*, 2005). Também é conhecido que, em artérias coronárias, o $ONOO^-$ pode reduzir a atividade de canais para o íon potássio (K^+), contribuindo para prejuízo no relaxamento mediado pelo endotélio (LIU *et al.*, 2002). Nossos dados de fluorescência demonstraram que além da reduzida quantidade de NO, o grupo Sham-75d apresentou maior presença de $O_2^{\bullet-}$. Desta forma, acreditamos que o menor relaxamento a ACh neste grupo pode ser também resultado das ações do $O_2^{\bullet-}$.

A exposição a espécies reativas, como as de oxigênio, providas de várias fontes levou os organismos vivos a desenvolverem mecanismos adaptativos de defesa (CADENAS, 1997). Os mecanismos de defesa que se contrapõem ao aumento dessas espécies reativas envolvem, dentre outros mecanismos, a defesa antioxidante enzimática que incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT) (VALKO *et al.*, 2007). A SOD, por exemplo, é capaz de promover a dismutação do $O_2^{\bullet-}$, ou seja, ela catalisa a reação do $O_2^{\bullet-}$, por meio de reações alternadas de redução e oxidação dos metais (Cobre e Manganês) presentes no sítio ativo da SOD (HASSAN; FRIDOVICH, 1981; OSMAN; BASCH, 1984; FARACI; DIDION, 2004). Esse processo de dismutação é caracterizado por uma reação química, conhecida por oxirredução, em que a mesma espécie reativa é oxidada e reduzida (BIELSKI; CABELLI, 1995). Nos vasos sanguíneos, há três isoformas de SOD que promovem a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ dando origem ao H_2O_2 , como metabólito da reação (OKADO-MATSUMOTO; FRIDOVICH, 2001). A isoforma Cu, Zn-SOD está localizada principalmente no citosol, núcleo e, em menor expressão, nas mitocôndrias (FARACI; DIDION, 2004), dismutando o $O_2^{\bullet-}$ e, por consequência, aumentando a biodisponibilidade do NO (MUGGE *et al.*, 1991). A atividade da isoforma Cu, Zn-SOD representa aproximadamente 50-80 % de todas as atividades de SOD na parede dos vasos sanguíneos (DIDION *et al.*, 2002). A isoforma Mn-SOD está localizada na mitocôndria e sua função é catalisar

a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ derivado das cadeias respiratórias (FARACI; DIDION, 2004). A terceira isoforma é a SOD extracelular (ecSOD) que, como seu nome sugere, está localizada extracelularmente e catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ extracelular protegendo assim a difusão do NO (TOHRU FUKAI, RODNEY J FOLZ, ULF LANDMESSER, 2002). Uma vez que em nosso estudo foi observado um aumento nos níveis de $O_2^{\bullet-}$ nos animais Sham-75d é possível que, embora não quantificado, tenha ocorrido uma modulação da SOD em relação a idade, associada à presença dos hormônios sexuais masculinos, como sugerido pela literatura (EL ASSAR; ANGULO; RODRÍGUEZ-MAÑAS, 2013).

É conhecido que o $ONOO^-$ formado a partir da reação do NO com $O_2^{\bullet-}$ promove diminuição da atividade da SOD com consequente diminuição da biodisponibilidade do NO e prejuízo no relaxamento vascular (COOKE; DAVIDGE, 2003; DEMICHELI; MORENO; RAD, 2018; GHEDDOUCHI et al., 2015; KAR; KAVDIA, 2013). Ainda, o $ONOO^-$ pode diminuir a formação de NO por, diretamente reduzir a atividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (ZOU; SHI; COHEN, 2002), bem como por estimular a oxidação do BH_4 , importante cofator para atividade da NOS (KOHEN et al., 2001). Nossos dados de fluorescência mostraram ainda que a quantidade de H_2O_2 foi menor no grupo Sham-75d e uma possibilidade para explicar esse achado pode estar relacionada a uma possível diminuição da atividade da SOD, haja visto níveis aumentados de $O_2^{\bullet-}$ neste mesmo grupo, bem como uma maior atividade da CAT. Assim sendo, justificaria o fato de termos observado maior intensidade de fluorescência ao $O_2^{\bullet-}$, bem como diminuição da biodisponibilidade do NO e redução na concentração de H_2O_2 . Desta forma, em nosso estudo, acreditamos que a presença dos andrógenos, aliada à progressão da idade, possa ter contribuído para o aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio, bem como para modulação de enzimas antioxidantes, que consequentemente levaria a menor biodisponibilidade de NO, assim prejudicando o relaxamento dependente do endotélio.

No que diz respeito à associação de andrógenos com a modulação da pressão arterial em ratos, estudos recentes apontam divergências quanto às ações desses hormônios. Enquanto Perusquía e colaboradores (PERUSQUÍA et al., 2017; PERUSQUÍA; CONTRERAS; HERRERA, 2019) demonstraram aumento

progressivo da pressão arterial média de ratos normotensos a partir da quinta semana de orquiectomia, Loh & Salleh (LOH; SALLEH, 2017) evidenciaram que ratos normotensos submetidos a oito semanas de orquiectomia tiveram uma diminuição na pressão arterial média em comparação ao seu controle. Em nosso estudo, embora as artérias mesentéricas de terceira ordem do grupo Sham-75d apresentaram diferenças morfológicas e funcionais (Figura 19), a pressão arterial desses animais não sofreu alteração ao longo tempo estudado. Além disso, a deficiência hormonal, promovida pela orquiectomia, não promoveu alteração na pressão arterial. Essas diferenças entre os diversos estudos, no que se refere a pressão arterial, pode estar relacionada ao *design* experimental utilizado em cada estudo. Nossos animais possuíam 8 semanas de vida no início do protocolo experimental, enquanto Perusquía e colaboradores iniciaram seus protocolos com animais mais velhos (18–21 semanas) (PERUSQUÍA *et al.*, 2017; PERUSQUÍA; CONTRERAS; HERRERA, 2019). Não obstante, nosso estudo foi realizado utilizando ratos da linhagem Wistar, enquanto Loh & Salleh conduziram seus estudos com Wistar Kyoto (LOH; SALLEH, 2017). Os mecanismos pelos quais os andrógenos podem modular a pressão sanguínea são bem estabelecidos em modelos de animais hipertensos (RECKELHOFF; ZHANG; GRANGER, 1997, 1998; RECKELHOFF *et al.*, 1999; RECKELHOFF; ZHANG; SRIVASTAVA, 2000). Contudo, o papel dos andrógenos sobre a pressão arterial em modelos animais normotensos ainda não está totalmente elucidado, embora já demonstrado que concentrações suprafisiológicas de testosterona possam aumentar a pressão arterial em ratos normotensos (ROUVER *et al.*, 2015).

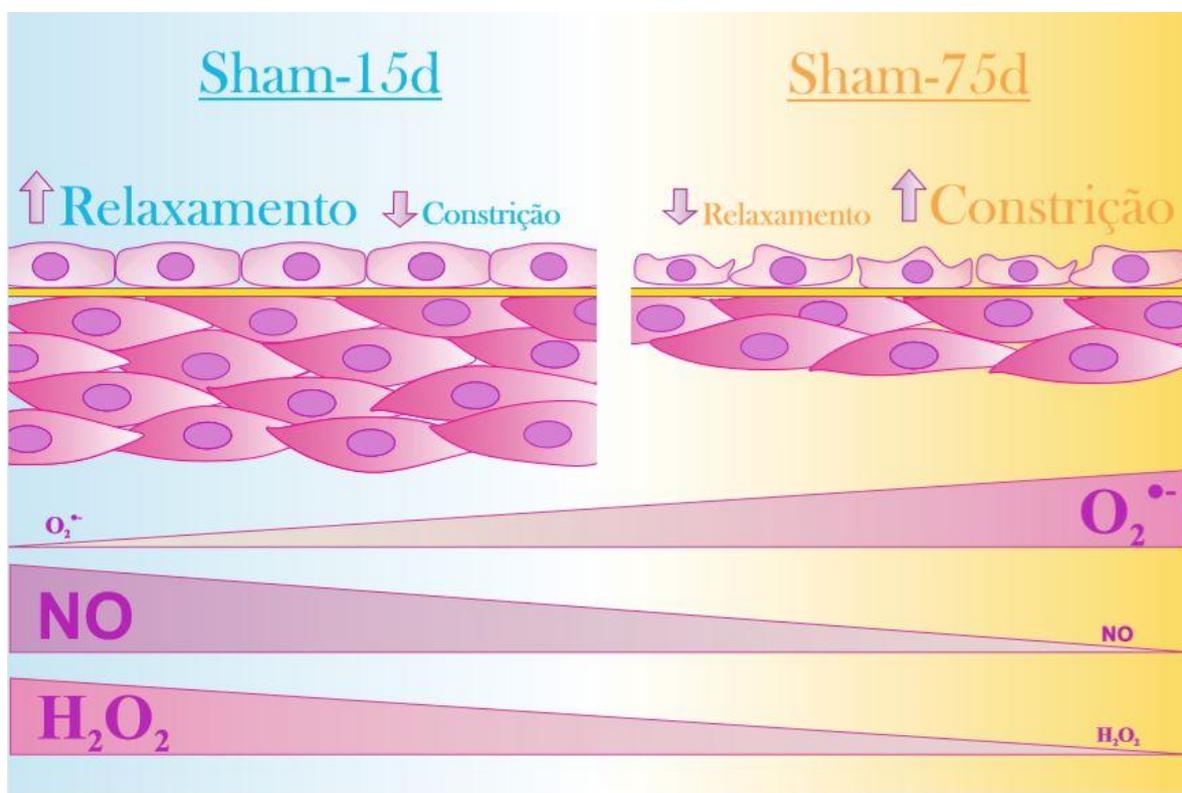


Figura 19 - Representação esquemática. Resumo gráfico dos principais achados do presente estudo. Os animais Sham-75d apresentaram prejuízo no relaxamento vascular e maior atividade contrátil nas artérias mesentéricas de terceira ordem comparado aos animais Sham-15d. Os animais Sham-75d apresentaram também maior fluorescência ao $O_2^{\bullet-}$ e menor fluorescência tanto ao NO quanto H_2O_2

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

A presença dos hormônios sexuais masculinos ao longo da idade é capaz de promover alterações morfológicas e funcionais em artérias mesentéricas de terceira ordem que justificam o prejuízo na função endotelial observado no presente estudo. Dentre as alterações encontradas, a redução da parede vascular, o aumento do lúmen, a menor produção de NO e H₂O₂ e a maior produção de O₂^{•-} poderiam justificar o aumento da resposta contrátil e o prejuízo no relaxamento vascular no grupo Sham-75d. Por fim, essas alterações podem estar relacionadas ao desenvolvimento de eventos cardiovasculares associadas ao sexo masculino e suas complicações com a progressão da idade

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

ADAMS, M. R.; WILLIAMS, J. K.; KAPLAN, J. R. Effects of Androgens on Coronary Artery Atherosclerosis and Atherosclerosis-Related Impairment of Vascular Responsiveness. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 15, n. 5, p. 562–570, 1995.

ADLER, A. et al. NAD(P)H oxidase-generated superoxide anion accounts for reduced control of myocardial O₂ consumption by NO in old Fischer 344 rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 285, n. 3, p. H1015–H1022, 2003.

ALMEIDA, M. C. et al. Pharmacological Blockade of the Cold Receptor TRPM8 Attenuates Autonomic and Behavioral Cold Defenses and Decreases Deep Body Temperature. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 6, p. 2086–2099, 2012.

ÁLVAREZ, E. et al. Testosterone and Cholesterol Vasodilation of Rat Aorta Involves L-Type Calcium Channel Inhibition. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2010, p. 1–10, 2010.

ALVES-LOPES, R. et al. Functional and structural changes in internal pudendal arteries underlie erectile dysfunction induced by androgen deprivation. **Asian Journal of Andrology**, v. 19, n. 5, p. 526–532, 2017.

ASKEW, E. B. et al. Modulation of androgen receptor activation function 2 by testosterone and dihydrotestosterone. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 35, p. 25801–25816, 2007.

ASUTHKAR, S. et al. The TRPM8 protein is a testosterone receptor: I. Biochemical evidence for direct TRPM8-testosterone interactions. **The Journal of biological chemistry**, v. 290, n. 5, p. 2659–69, 2015a.

ASUTHKAR, S. et al. TRPM8 channel as a novel molecular target in androgen-

regulated prostate cancer cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 19, p. 17221–36, 2015b.

BALDO, M. P. et al. Long-term use of low-dose spironolactone in spontaneously hypertensive rats: effects on left ventricular hypertrophy and stiffness. **Pharmacological reports : PR**, v. 63, n. 4, p. 975–82, 2011.

BARON, S. et al. Androgen Receptor Mediates Non-genomic Activation of Phosphatidylinositol 3-OH Kinase in Androgen-sensitive Epithelial Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 15, p. 14579–14586, 2004.

BARTEN, E. J.; NEWLING, D. W. W. Transplantation of the testis; from the past to the present. **International Journal of Andrology**, v. 19, n. 4, p. 205–211, 1996.

BATALLER, R. et al. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 9, p. 1383–1394, 2003.

BENJAMIN, E. J. et al. Heart disease and stroke statistics - 2018 update: A report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 137, n. 12, p. E67–E492, 2018.

BENNETT, N. C. et al. Molecular cell biology of androgen receptor signalling. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 42, n. 6, p. 813–827, 2010.

BENTEN, W. P. M. et al. Testosterone signaling through internalizable surface receptors in androgen receptor-free macrophages. **Molecular Biology of the Cell**, v. 10, n. 10, p. 3113–3123, 1999a.

BENTEN, W. P. M. et al. Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells. **The FASEB Journal**, v. 13, n. 1, p. 123–133, 1999b.

BERTHOLD, A. A. Über die Transplantation der Hoden. **Archiv fur Anatomie, Physiologie und Wissenschaftliche Medicin**, p. 42–46, 1849.

BIELSKI, B. H. J.; CABELLI, D. E. Superoxide and Hydroxyl Radical Chemistry in Aqueous Solution. In: **Active Oxygen in Chemistry**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1995. p. 66–104.

BLOUIN, K.; BOIVIN, A.; TCHERNOF, A. Androgens and body fat distribution. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 108, n. 3–5, p. 272–280, 2008.

BORELL, M. Brown-Séquard's organotherapy and its appearance in America at the end of the nineteenth century. **Bulletin of the history of medicine**, v. 50, n. 3, p. 309–20, 1976.

BRASIL. **Normativas do CONCEA para produção, manutenção de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica: lei, decreto, portarias, resoluções, normativas e orientações técnicas**. 3. ed. Brasília: [s.n.].

BROWN-SÉQUARD, E. et al. The effects produced in man by subcutaneous injections of a liquid obtained from the testicles of animals. **Lancet**, v. 20, p. 105–107, 1889.

BRUCHOVSKY, N.; WILSON, J. D. The conversion of testosterone to 5-alpha-androstan-17-beta-ol-3-one by rat prostate in vivo and in vitro. **The Journal of biological chemistry**, v. 243, n. 8, p. 2012–21, 1968.

BRUCHOVSKY, N.; WILSON, J. D. Discovery of the role of dihydrotestosterone in androgen action☆. **Steroids**, v. 64, n. 11, p. 753–759, 1999.

BUCCI, M. et al. Hydrogen Sulphide Is Involved in Testosterone Vascular Effect. **European Urology**, v. 56, n. 2, p. 378–384, 2009.

BURGER, H. G. Androgen production in women. **Fertility and Sterility**, v. 77, p. 3–5, 2002.

BUTENANDT, A. Über die chemische Untersuchung der Sexualhormone. **Zeitschrift für Angewandte Chemie**, v. 44, n. 46, p. 905–908, 1931.

BUTENANDT, A.; HANISCH, G. Über Testosteron. Umwandlung des Dehydroandrosterons in Androstendiol und Testosteron; ein Weg zur Darstellung des Testosterons aus Cholesterin. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie**, v. 237, n. 1–3, p. 89–97, 1935.

CADENAS, E. Basic mechanisms of antioxidant activity. **BioFactors**, v. 6, n. 4, p. 391–397, 1997.

CATO, A. C. B.; NESTL, A.; MINK, S. Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. **Science's STKE: signal transduction knowledge environment**, v. 2002, n. 138, p. re9, 2002.

CELERMAJER, D. S. et al. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 24, n. 2, p. 471–476, 1994.

CHEN, Y. F.; NAFTILAN, A. J.; OPARIL, S. Androgen-dependent angiotensinogen and renin messenger RNA expression in hypertensive rats. **Hypertension**, v. 19, n. 5, p. 456–463, 1992.

CHIGNALIA, A. Z. et al. Testosterone induces vascular smooth muscle cell migration by NADPH oxidase and c-Src-dependent pathways. **Hypertension**, v. 59, n. 6, p. 1263–1271, 2012.

CLAESSENS, F. et al. Selective DNA binding by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific gene regulation. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 72, n. 1-5, p. 23-30, 2001.

CLARK, B. J.; STOCCO, D. M. StAR—A tissue specific acute mediator of steroidogenesis. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 7, n. 7, p. 227–233, 1996.

COOKE, C. L. M.; DAVIDGE, S. T. Endothelial-dependent vasodilation is reduced in mesenteric arteries from superoxide dismutase knockout mice. **Cardiovascular Research**, v. 60, n. 3, p. 635–642, 2003.

CORRÊA, R. DE A. F. et al. Testosterone deficiency reduces the effects of late cardiac remodeling after acute myocardial infarction in rats. **PLoS ONE**, v. 14, n. 3, 2019.

COSTA, E. D. et al. Neuronal nitric oxide synthase contributes to the normalization of blood pressure in medicated hypertensive patients. **Nitric oxide : biology and chemistry**, v. 80, p. 98–107, 2018.

COSTA, T. J. et al. Association of testosterone with estrogen abolishes the beneficial effects of estrogen treatment by increasing ROS generation in aorta endothelial cells. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 308, n. 7, p. H723–H732, 2015.

CRUZ-TOPETE, D.; DOMINIC, P.; STOKES, K. Y. Uncovering sex-specific mechanisms of action of testosterone and redox balance. **Redox Biology**, p. 101490, 2020.

CSISZAR, A. et al. Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. **Circulation Research**, v. 90, n. 11, p. 1159–1166, 2002.

CSISZAR, A. et al. Vascular aging in the longest-living rodent, the naked mole rat. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 293, n. 2, p. H919–H927, 2007.

CSISZAR, A. et al. Age-Associated Proinflammatory Secretory Phenotype in Vascular Smooth Muscle Cells From the Non-human Primate *Macaca mulatta*: Reversal by Resveratrol Treatment. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 67, n. 8, p. 811–820, 2012.

CSISZAR, A. et al. Caloric restriction confers persistent anti-oxidative, pro-angiogenic, and anti-inflammatory effects and promotes anti-aging miRNA expression profile in cerebromicrovascular endothelial cells of aged rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 307, n. 3, p. H292–H306, 2014.

CUSSONS, A. J. et al. Brown-Séquard revisited: a lesson from history on the placebo effect of androgen treatment. **The Medical journal of Australia**, v. 177, n. 11–12, p. 678–9, 2002.

DALMASSO, C. et al. Cardiovascular and Metabolic Consequences of Testosterone Supplements in Young and Old Male Spontaneously Hypertensive Rats: Implications for Testosterone Supplements in Men. **Journal of the American Heart Association**, v. 6, n. 10, 2017.

DAVID, K. et al. Über krystallinisches männliches Hormon aus Hoden (Testosteron), wirksamer als aus Harn oder aus Cholesterin bereitetes Androsteron. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie**, v. 233, n. 5–6, p. 281–283, 1935.

DEENADAYALU, V. et al. Testosterone-induced relaxation of coronary arteries: activation of BK_{ca} channels via the cGMP-dependent protein kinase. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 302, n. 1, p. H115–H123, 2012.

DELP, M. D. et al. Ageing diminishes endothelium-dependent vasodilatation and tetrahydrobiopterin content in rat skeletal muscle arterioles. **The Journal of physiology**, v. 586, n. 4, p. 1161–8, 2008.

DEMICHELI, V.; MORENO, D. M.; RADI, R. Human Mn-superoxide dismutase inactivation by peroxynitrite: a paradigm of metal-catalyzed tyrosine nitration in vitro and in vivo. **Metallomics**, v. 10, n. 5, p. 679–695, 2018.

DIDION, S. P. et al. Increased superoxide and vascular dysfunction in CuZnSOD-

deficient mice. **Circulation Research**, v. 91, n. 10, p. 938–944, 2002.

DING, A. Q.; STALLONE, J. N. Testosterone-induced relaxation of rat aorta is androgen structure specific and involves K⁺ channel activation. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, n. 6, p. 2742–2750, 2001.

DONATO, A. J. et al. Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans: Relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor- κ B. **Circulation Research**, v. 100, n. 11, p. 1659–1666, 2007.

DORA, K. A.; DOYLE, M. P.; DULING, B. R. Elevation of intracellular calcium in smooth muscle causes endothelial cell generation of NO in arterioles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 12, p. 6529–6534, 1997.

DOS SANTOS, R. L. et al. Tributyltin Impairs the Coronary Vasodilation Induced by 17 β -Estradiol in Isolated Rat Heart. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 75, n. 16–17, p. 948–959, 2012.

DUFAU, M. L. Endocrine Regulation and Communicating Functions of the Leydig Cell. **Annual Review of Physiology**, v. 50, n. 1, p. 483–508, 1988.

DUFAU, M. L. The luteinizing hormone receptor. **Annual Review of Physiology**, v. 60, n. 1, p. 461–496, 1998.

EGASHIRA, K. et al. Effects of age on endothelium-dependent vasodilation of resistance coronary artery by acetylcholine in humans. **Circulation**, v. 88, n. 1, p. 77–81, 1993.

EL ASSAR, M.; ANGULO, J.; RODRÍGUEZ-MAÑAS, L. Oxidative stress and vascular inflammation in aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 380–401, 2013.

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.

ENGLISH, K. M. et al. Aging reduces the responsiveness of coronary arteries from male Wistar rats to the vasodilatory action of testosterone. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 99, n. 1, p. 77–82, 2000.

FARACI, F. M.; DIDION, S. P. Vascular Protection. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, n. 8, p. 1367–1373, 2004.

FARHAT, M. Y.; LAVIGNE, M. C.; RAMWELL, P. W. The vascular protective effects of estrogen. **The FASEB Journal**, v. 10, n. 5, p. 615–624, 1996.

FÉLÉTOU, M.; KÖHLER, R.; VANHOUTTE, P. M. Nitric oxide: Orchestrator of endothelium-dependent responses. **Annals of Medicine**, v. 44, n. 7, p. 694–716, 2012.

FELIX-PATRÍCIO, B. et al. The prostate after castration and hormone replacement in a rat model: structural and ultrastructural analysis. **International braz j urol**, v. 43, n. 5, p. 957–965, 2017.

FERRER, M. et al. Androgen deprivation facilitates acetylcholine-induced relaxation by superoxide anion generation. **Clinical Science**, v. 97, n. 6, p. 625–631, 1999.

FEVOLD, H. R. et al. Rat P45017 α from testis: Characterization of a full-length cDNA encoding a unique steroid hydroxylase capable of catalyzing both Δ 4- and Δ 5-steroid-17,20-lyase reactions. **Molecular Endocrinology**, v. 3, n. 6, p. 968–975, 1989.

FLÜCK, C. E.; MILLER, W. L.; AUCHUS, R. J. The 17, 20-lyase activity of cytochrome P450c17 from human fetal testis favors the Δ 5 steroidogenic pathway. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, n. 8, p. 3762–3766, 2003.

FLÜCK, C. E.; PANDEY, A. V. Steroidogenesis of the testis - new genes and pathways. **Annales d'Endocrinologie**, v. 75, n. 2, p. 40–47, 2014.

FORADORI, C. D.; WEISER, M. J.; HANDA, R. J. Non-genomic actions of androgens. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 29, n. 2, p. 169–181, 2008.

FÖRSTERMANN, U.; LI, H. Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. **British journal of pharmacology**, v. 164, n. 2, p. 213–23, 2011.

FORTUNATI, N. Sex hormone-binding globulin: not only a transport protein. What news is around the corner? **Journal of endocrinological investigation**, v. 22, n. 3, p. 223–34, 1999.

FRANQUINI, J. V. M. et al. Nandrolone decanoate determines cardiac remodelling and injury by an imbalance in cardiac inflammatory cytokines and ACE activity, blunting of the Bezold-Jarisch reflex, resulting in the development of hypertension. **Steroids**, v. 78, n. 3, p. 379–385, 2013.

FU, L.; GAO, Q. P.; SHEN, J. X. Relationship between testosterone and indexes indicating endothelial function in male coronary heart disease patients. **Asian Journal of Andrology**, v. 10, n. 2, p. 214–218, 2008.

FUKUI, M. et al. Role of Endogenous Androgen Against Insulin Resistance and Athero-sclerosis in Men with Type 2 Diabetes. **Current Diabetes Reviews**, v. 3, n. 1, p. 25–31, 2007.

FURCHGOTT, R. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **The FASEB Journal**, v. 3, n. 9, p. 2007–2018, 1989.

GHEDDOUCHI, S. et al. Low SOD activity is associated with overproduction of peroxynitrite and nitric oxide in patients with acute coronary syndrome. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 49, p. 40–46, 2015.

GIESEN, J. A. S. et al. Sex differences in progesterone-induced relaxation in the coronary bed from normotensive rats. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 64,

n. 2, p. 91–102, 2020.

GRINO, P. B.; GRIFFIN, J. E.; WILSON, J. D. Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. **Endocrinology**, v. 126, n. 2, p. 1165–1172, 1990.

HAMMOND, G. L.; BOCCHINFUSO, W. P. Sex hormone-binding globulin: gene organization and structure/function analyses. **Hormone research**, v. 45, n. 3–5, p. 197–201, 1996.

HARNO, E. et al. Evidence for the presence of GPRC6A receptors in rat mesenteric arteries. **Cell Calcium**, v. 44, n. 2, p. 210–219, 2008.

HASSAN, H. M.; FRIDOVICH, I. Chemistry and biochemistry of superoxide dismutases. **European journal of rheumatology and inflammation**, v. 4, n. 2, p. 160–72, 1981.

HATAKE, K. et al. Effect of aging on endothelium-dependent vascular relaxation of isolated human basilar artery to thrombin and bradykinin. **Stroke**, v. 21, n. 7, p. 1039–1043, 1990.

HATANO, Y. et al. The contractile responses of isolated dog cerebral and extracerebral arteries to oxybarbiturates and thiobarbiturates. **Anesthesiology**, v. 71, n. 1, p. 80–6, 1989.

HEEMERS, H. V.; VERHOEVEN, G.; SWINNEN, J. V. Androgen activation of the sterol regulatory element-binding protein pathway: Current insights. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 20, n. 10, p. 2265–77, 2006.

HEINLEIN, C. A.; CHANG, C. The Roles of Androgen Receptors and Androgen-Binding Proteins in Nongenomic Androgen Actions. **Molecular Endocrinology**, v. 16, n. 10, p. 2181–2187, 2002a.

HEINLEIN, C. A.; CHANG, C. Androgen Receptor (AR) Coregulators: An Overview.

Endocrine Reviews, v. 23, n. 2, p. 175–200, 2002b.

HERALD, A. K. L. et al. Genomic and non-genomic effects of androgens in the cardiovascular system: clinical implications. **Clinical Science**, v. 131, n. 13, 2017.

HERINGER, O. A. et al. Relationship between male hormonal status, Bezold-Jarisch reflex function, and ACE activity (cardiac and plasmatic). **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 94, n. 2, p. 231–236, 2016.

HERMAN, S. M. et al. Androgen deprivation is associated with enhanced endothelium-dependent dilatation in adult men. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 17, n. 10, p. 2004–9, 1997.

HIGASHI, Y. et al. Tetrahydrobiopterin improves aging-related impairment of endothelium-dependent vasodilation through increase in nitric oxide production. **Atherosclerosis**, v. 186, n. 2, p. 390–395, 2006.

HIIPAKKA, R. A.; LIAO, S. Molecular Mechanism of Androgen Action. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 9, n. 8, p. 317–324, 1998.

HRYB, D. J.; KHAN, M. S.; ROSNER, W. Testosterone-estradiol-binding globulin binds to human prostatic cell membranes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 128, n. 1, p. 432–40, 1985.

HUANG, F. et al. TRPM8 downregulation by angiotensin II in vascular smooth muscle cells is involved in hypertension. **Molecular Medicine Reports**, v. 15, n. 4, p. 1900–1908, 2017.

ILIESCU, R. et al. Impact of androgen-induced oxidative stress on hypertension in male SHR. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 2, 2007.

ISIDORO, L.; FERRER, M.; PERUSQUÍA, M. Vasoactive androgens: Vasorelaxing effects and their potential regulation of blood pressure. **Endocrine Research**, v. 43,

n. 3, p. 166–175, 2018.

JABLONSKI, K. L. et al. High-dose ascorbic acid infusion abolishes chronic vasoconstriction and restores resting leg blood flow in healthy older men. **Journal of Applied Physiology**, v. 103, n. 5, p. 1715–1721, 2007.

JACOBSON, A. et al. Aging enhances pressure-induced arterial superoxide formation. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 293, n. 3, 2007.

JÉQUIER, E.; TAPPY, L. Regulation of Body Weight in Humans. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 2, p. 451–480, 1999.

JONES, R. D. et al. Testosterone-induced coronary vasodilatation occurs via a non-genomic mechanism: Evidence of a direct calcium antagonism action. **Clinical Science**, v. 107, n. 2, p. 149–158, 2004.

JUSTULIN, L. A. et al. Differential proliferative response of the ventral prostate and seminal vesicle to testosterone replacement. **Cell biology international**, v. 30, n. 4, p. 354–64, 2006.

KAR, S.; KAVDIA, M. Endothelial NO and O₂ production rates differentially regulate oxidative, nitroxidative, and nitrosative stress in the microcirculation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 63, p. 161–174, 2013.

KISHORE, S. P. et al. Modernizing the World Health Organization List of Essential Medicines for Preventing and Controlling Cardiovascular Diseases. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 71, n. 5, p. 564–574, 2018.

KNOCK, G. A. et al. Superoxide constricts rat pulmonary arteries via Rho-kinase-mediated Ca²⁺ sensitization. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 5, p. 633–642, 2009.

KOHNEN, S. L. et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite or oxoferryl

species occurs by a radical pathway. **Free Radical Research**, v. 35, n. 6, p. 709–721, 2001.

KONOPLYA, E. F.; POPOFF, E. H. Identification of the classical androgen receptor in male rat liver and prostate cell plasma membranes. **International Journal of Biochemistry**, v. 24, n. 12, p. 1979–1983, 1992.

KRUPENKO, S. A.; KRUPENKO, N. I.; DANZO, B. J. Interaction of sex hormone-binding globulin with plasma membranes from the rat epididymis and other tissues. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 51, n. 1–2, p. 115–24, 1994.

KUDO, I.; MURAKAMI, M. Phospholipase A2 enzymes. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 68–69, p. 3–58, 2002.

LACOLLEY, P.; REGNAULT, V.; AVOLIO, A. P. Smooth muscle cell and arterial aging: basic and clinical aspects. **Cardiovascular Research**, v. 114, n. 4, p. 513–528, 2018.

LANGFORT, J. et al. Testosterone affects hormone-sensitive lipase (HSL) activity and lipid metabolism in the left ventricle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 399, n. 4, p. 670–676, 2010.

LAURSEN, J. B. et al. Endothelial regulation of vasomotion in ApoE-deficient mice: Implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. **Circulation**, v. 103, n. 9, p. 1282–1288, 2001.

LEE, H.-K.; LEE, J. K.; CHO, B. The Role of Androgen in the Adipose Tissue of Males. **The World Journal of Men's Health**, v. 31, n. 2, p. 136, 2013.

LEE, Y. F. et al. Convergence of two repressors through heterodimer formation of androgen receptor and testicular orphan receptor-4: A unique signaling pathway in the steroid receptor superfamily. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 26, p. 14723–14729, 1999.

LI, J.; AL-AZZAWI, F. Mechanism of androgen receptor action. **Maturitas**, v. 63, n. 2, p. 142–148, 2009.

LIEGIBEL, U. M. et al. Androgen receptor isoforms AR-A and AR-B display functional differences in cultured human bone cells and genital skin fibroblasts. **Steroids**, v. 68, n. 14, p. 1179–1187, 2003.

LIU, P. Y.; DEATH, A. K.; HANDELSMAN, D. J. Androgens and cardiovascular disease. **Endocrine reviews**, v. 24, n. 3, p. 313–40, 2003.

LIU, Y. et al. Peroxynitrite inhibits Ca²⁺-activated K⁺ channel activity in smooth muscle of human coronary arterioles. **Circulation Research**, v. 91, n. 11, p. 1070–1076, 2002.

LOH, S.; SALLEH, N. Influence of testosterone on mean arterial pressure: A physiological study in male and female normotensive WKY and hypertensive SHR rats. **Physiology International**, v. 104, n. 1, p. 25–34, 2017.

LOO, S. Y. et al. Testosterone replacement therapy and the risk of stroke in men: A systematic review. **Maturitas**, v. 106, p. 31–37, 2017.

LOPES, R. A. M. et al. Testosterone and Vascular Function in Aging. **Frontiers in Physiology**, v. 3, n. 89, p. 1–9, 2012.

LOPEZ, D. S.; CANFIELD, S.; WANG, R. Testosterone replacement therapy and the heart: friend, foe or bystander? **Translational andrology and urology**, v. 5, n. 6, p. 898–908, 2016.

LYDSTON, G. F. Sex gland implantation. **Journal of the American Medical Association**, v. LXVI, n. 20, p. 1540–1543, 1916.

MALACHIAS, M. V. B. et al. Cardiovascular risk stratification. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, n. 3, p. 18–24, 2016.

MANGELSDORF, D. J.; EVANS, R. M. The RXR heterodimers and orphan receptors. **Cell**, v. 83, n. 6, p. 841–850, 1995.

MARANON, R.; RECKELHOFF, J. F. Sex and gender differences in control of blood pressure. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 125, n. 7, p. 311–8, 2013.

MARCELLI, M. Androgen Receptor in Health and Disease. In: **Testosterone**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 21–73.

MARIN, R. et al. Androgen-Dependent Nitric Oxide Release in Rat Penis Correlates with Levels of Constitutive Nitric Oxide Synthase Isoenzymes. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 4, p. 1012–1016, 1999.

MCCREDIE, R. J. et al. Vascular reactivity is impaired in genetic females taking high-dose androgens. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 32, n. 5, p. 1331–5, 1998.

MCCULLOCH, A. I.; RANDALL, M. D. Sex differences in the relative contributions of nitric oxide and EDHF to agonist-stimulated endothelium-dependent relaxations in the rat isolated mesenteric arterial bed. **British Journal of Pharmacology**, v. 123, n. 8, p. 1700–1706, 1998.

MEAD, J. R.; IRVINE, S. A.; RAMJI, D. P. Lipoprotein lipase: Structure, function, regulation, and role in disease. **Journal of Molecular Medicine**, v. 80, n. 12, p. 753–769, 2002.

MELICOW, M. M. Castration down the ages. **New York state journal of medicine**, v. 77, n. 5, p. 804–5, 1977.

MENDEL, C. M. The Free Hormone Hypothesis: A Physiologically Based Mathematical Model*. **Endocrine Reviews**, v. 10, n. 3, p. 232–274, 1989.

MENDELSON, M. E.; KARAS, R. H. Molecular and cellular basis of cardiovascular

gender differences. **Science (New York, N.Y.)**, v. 308, n. 5728, p. 1583–7, 2005.

MILLER, V. M.; MITCHELL HARMAN, S. An update on hormone therapy in postmenopausal women: Mini-review for the basic scientist. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 313, n. 5, p. H1013–H1021, 2017.

MILLER, W. L.; AUCHUS, R. J. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. **Endocrine Reviews**, v. 32, n. 1, p. 81–151, 2011.

MORGENTALER, A.; TRAISH, A. The History of Testosterone and the Evolution of its Therapeutic Potential. **Sexual Medicine Reviews**, v. 8, n. 2, p. 286-296, 2018.

MOSCA, L. et al. Evidence-Based Guidelines for Cardiovascular Disease Prevention in Women: 2007 Update. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 49, n. 11, p. 1230–1250, 2007.

MUGGE, A. et al. Release of intact endothelium-derived relaxing factor depends on endothelial superoxide dismutase activity. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 260, n. 2, p. 29-2, 1991.

MUKHERJEE, D. et al. Role of Androgens in Cardiovascular Diseases in Men: A Comprehensive Review. In: **Chemistry and Biological Activity of Steroids**. [s.l.] IntechOpen, 2020.

MULVANY, M. J.; HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circulation Research**, v. 41, n. 1, p. 19–26, 1977.

NAKHLA, A. M. et al. Sex hormone-binding globulin receptor signal transduction proceeds via a G protein. **Steroids**, v. 64, n. 3, p. 213–6, 1999.

NAKHLA, A. M.; ROSNER, W. Stimulation of prostate cancer growth by androgens

and estrogens through the intermediacy of sex hormone-binding globulin. **Endocrinology**, v. 137, n. 10, p. 4126–4129, 1996.

NASCIMENTO, B. R. et al. Cardiovascular disease epidemiology in Portuguese-speaking countries: Data from the global burden of disease, 1990 to 2016. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 110, n. 6, p. 500–511, 2018.

NEGRO-VILAR, A. Selective Androgen Receptor Modulators (SARMs): A Novel Approach to Androgen Therapy for the New Millennium. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 84, n. 10, p. 3459–3462, 1999.

NIESCHLAG, E.; NIESCHLAG, S. Testosterone deficiency: A historical perspective. **Asian Journal of Andrology**, v. 16, n. 2, p. 161–168, 2014.

NIESCHLAG, E.; NIESCHLAG, S. The history of discovery, synthesis and development of testosterone for clinical use. **European Journal of Endocrinology**, v. 180, n. 6, p. R201–R212, 2019.

NOVELLA, S. et al. Aging enhances contraction to thromboxane A₂ in aorta from female senescence-accelerated mice. **Age**, v. 35, n. 1, p. 117–128, 2013.

OETTEL, M. Is there a role for estrogens in the maintenance of men's health? **Aging Male**, v. 5, n. 4, p. 248–257, 2002.

OETTEL, M. The endocrine pharmacology of testosterone therapy in men. **Naturwissenschaften**, v. 91, n. 2, p. 66–76, 2004.

OKADO-MATSUMOTO, A.; FRIDOVICH, I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver. Cu,Zn-SOD in mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 42, p. 38388–38393, 2001.

OLOYO, A. K.; SOFOLA, O. A.; YAKUBU, M. A. Orchidectomy attenuates high-salt diet-induced increases in blood pressure, renovascular resistance, and hind limb vascular dysfunction: role of testosterone. **Clinical and Experimental**

Pharmacology and Physiology, v. 43, n. 9, p. 825–833, 2016.

OSKUI, P. M. et al. Testosterone and the cardiovascular system: a comprehensive review of the clinical literature. **Journal of the American Heart Association**, v. 2, n. 6, p. e000272, 2013.

OSMAN, R.; BASCH, H. On the Mechanism of Action of Superoxide Dismutase: A Theoretical Study. **Journal of the American Chemical Society**, v. 106, n. 19, p. 5710–5714, 1984.

PAIK, Y. H. et al. Role of NADPH oxidases in liver fibrosis. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 20, n. 17, p. 2854–2872, 2014.

PANTALONE, K. M. et al. Testosterone replacement therapy and the risk of adverse cardiovascular outcomes and mortality. **Basic and Clinical Andrology**, v. 29, n. 1, 2019.

PEIER, A. M. et al. A TRP Channel that Senses Cold Stimuli and Menthol. **Cell**, v. 108, n. 5, p. 705–715, 2002.

PEIXOTO, P. et al. Sex difference in GPER expression does not change vascular relaxation or reactive oxygen species generation in rat mesenteric resistance arteries. **Life Sciences**, v. 211, p. 198–205, 2018.

PERUSQUÍA, M. et al. Systemic hypotensive effects of testosterone are androgen structure-specific and neuronal nitric oxide synthase-dependent. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 309, n. 2, p. R189-95, 2015.

PERUSQUÍA, M. et al. Antihypertensive effects of androgens in conscious, spontaneously hypertensive rats. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 167, p. 106–114, 2017.

PERUSQUÍA, M.; CONTRERAS, D.; HERRERA, N. Hypotestosteronemia is an

important factor for the development of hypertension: elevated blood pressure in orchidectomized conscious rats is reversed by different androgens. **Endocrine**, v. 65, n. 2, p. 416–425, 2019.

PERUSQUÍA, M.; STALLONE, J. N. Do androgens play a beneficial role in the regulation of vascular tone? Nongenomic vascular effects of testosterone metabolites. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 298, n. 5, p. H1301-7, 2010.

PI, M. et al. Impaired osteoblast function in GPRC6A null mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 5, p. 1092–102, 2010.

PI, M. et al. Structural and Functional Evidence for Testosterone Activation of GPRC6A in Peripheral Tissues. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 29, n. 12, p. 1759–73, 2015.

PI, M.; PARRILL, A. L.; QUARLES, L. D. GPRC6A mediates the non-genomic effects of steroids. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 51, p. 39953–64, 2010.

PIERCE, G. L.; LAROCCA, T. J. Reduced vascular tetrahydrobiopterin (BH4) and endothelial function with ageing: Is it time for a chronic BH4 supplementation trial in middle-aged and older adults? **Journal of Physiology**, v. 586, n. 11, p. 2673–2674, 2008.

PRÉCOMA, D. B. et al. Updated cardiovascular prevention guideline of the Brazilian society of cardiology – 2019. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 113, n. 4, p. 787–891, 2019.

PUTTABYATAPPA, Y. et al. Peroxynitrite mediates testosterone-induced vasodilation of microvascular resistance vessels. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 345, n. 1, p. 7–14, 2013.

QIAO, X.; MCCONNELL, K. R.; KHALIL, R. A. Sex steroids and vascular responses in hypertension and aging. **Gender Medicine**, v. 5, n. SUPPL. 1, 2008.

QUINN, R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 21, n. 6, p. 775–7, 2005.

RAMÍREZ-ROSAS, M. B. et al. Pharmacological evidence that Ca²⁺ channels and, to a lesser extent, K⁺ channels mediate the relaxation of testosterone in the canine basilar artery. **Steroids**, v. 76, n. 4, p. 409–15, 2011.

RECKELHOFF, J. F. et al. Gender Differences in Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 34, n. 4, p. 920–923, 1999.

RECKELHOFF, J. F.; ZHANG, H.; GRANGER, J. P. Decline in renal hemodynamic function in aging SHR: role of androgens. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 30, n. 3 Pt 2, p. 677–81, 1997.

RECKELHOFF, J. F.; ZHANG, H.; GRANGER, J. P. Testosterone Exacerbates Hypertension and Reduces Pressure-Natriuresis in Male Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 31, n. 1, p. 435–439, 1998.

RECKELHOFF, J. F.; ZHANG, H.; SRIVASTAVA, K. Gender differences in development of hypertension in spontaneously hypertensive rats: role of the renin-angiotensin system. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 35, n. 1 Pt 2, p. 480–3, 2000.

RODIÑO-JANEIRO, B. K. et al. Current status of NADPH oxidase research in cardiovascular pharmacology. **Vascular Health and Risk Management**, v. 9, n. 1, p. 401–428, 2013.

ROSANO, G. M. C.; SPOLETINI, I.; VITALE, C. Cardiovascular disease in women, is it different to men? The role of sex hormones. **Climacteric**, v. 20, n. 2, p. 125–128, 2017.

ROSNER, W. et al. Androgens, Estrogens, and Second Messengers. **Steroids**, v. 63, n. 5–6, p. 278–281, 1998.

ROSNERA, W. et al. Androgen and estrogen signaling at the cell membrane via g-proteins and cyclic adenosine monophosphate. **Steroids**, v. 64, n. 1–2, p. 100–106, 1999.

ROUVER, W. N. et al. Testosterone Replacement Therapy Prevents Alterations of Coronary Vascular Reactivity Caused by Hormone Deficiency Induced by Castration. **PloS one**, v. 10, n. 8, p. e0137111, 2015.

ROY, A. K. et al. Regulation of androgen action. **Vitamins and hormones**, v. 55, p. 309–52, 1999.

RUZICKA, L.; WETTSTEIN, A. Sexualhormone VII. Über die künstliche Herstellung des Testikelhormons Testosteron (Androsten-3-on-17-ol). **Helvetica Chimica Acta**, v. 18, n. 1, p. 1264–1275, 1935.

SÁ, E. Q. C. DE et al. Testosterona sérica e doença cardiovascular em homens. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 8, p. 915–922, 2009.

SAKATA, K. et al. Effects of endothelin on the mechanical activity and cytosolic calcium levels of various types of smooth muscle. **British Journal of Pharmacology**, v. 98, n. 2, p. 483–492, 1989.

SATOH, M. et al. NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 288, n. 6, p. 57-6, 2005.

SCHIFFER, L.; ARLT, W.; STORBECK, K. H. Intracrine androgen biosynthesis, metabolism and action revisited. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 465, p. 4–26, 2018.

SCHRÖR, K. et al. Testosterone treatment enhances thromboxane A2 mimetic induced coronary artery vasoconstriction in guinea pigs. **European journal of**

clinical investigation, v. 24 Suppl 1, p. 50–2, 1994.

SENGUPTA, P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. **International journal of preventive medicine**, v. 4, n. 6, p. 624–30, 2013.

SESSA, W. C. Regulation of endothelial derived nitric oxide in health and disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. SUPPL. 1, p. 15–18, 2005.

SETCHELL, B. P. The testis and tissue transplantation: historical aspects. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 18, n. 1, p. 1–8, 1990.

SIITERI, P. K. et al. The serum transport of steroid hormones. **Recent progress in hormone research**, v. 38, p. 457–510, 1982.

SILVA, M. A. et al. Testosterone Levels and Development of the Penile Spines and Testicular Tissue during the Postnatal Growth in Wistar Rats. **Advances in Sexual Medicine**, v. 03, n. 03, p. 1–9, 2013.

SINGH, N. et al. Ageing is associated with impairment of nitric oxide and prostanoid dilator pathways in the human forearm. **Clinical Science**, v. 102, n. 5, p. 595–600, 2002.

SINGH, R. et al. Castration increases and androgens decrease nitric oxide synthase activity in the brain: physiologic implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 7, p. 3672–7, 2000.

SKOGASTIERNA, C. et al. A supraphysiological dose of testosterone induces nitric oxide production and oxidative stress. **European journal of preventive cardiology**, v. 21, n. 8, p. 1049–54, 2014.

SLEZÁK, P. et al. Accurate normalization factor for wire myography of rat femoral artery. **Physiological Research**, v. 59, n. 6, p. 1033–1036, 2010.

STANKEVICIUS, E. et al. Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, v. 39, n. 4, p. 333–341, 2003.

STANLEY, L. L. Experiences in testicle transplantation. **California state journal of medicine**, v. 18, n. 7, p. 251–3, 1920.

STEINACH, E.; KUN, H. Transformation of male sex hormones into a substance with the action of a female hormone. **The Lancet**, v. 230, n. 5954, p. 845, 1937.

SUN, D. et al. Reduced release of nitric oxide to shear stress in mesenteric arteries of aged rats. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 286, n. 6 55-6, 2004.

SVARTBERG, J. et al. Association of endogenous testosterone with blood pressure and left ventricular mass in men. The Tromsø study. **European Journal of Endocrinology**, v. 150, n. 1, p. 65–71, 2004.

TADDEI, S. et al. Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension. **Circulation**, v. 91, n. 7, p. 1981–1987, 1995.

TAJINO, K. et al. Cooling-Sensitive TRPM8 Is Thermostat of Skin Temperature against Cooling. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, p. e17504, 2011.

TEOH, H. et al. Differential effects of 17beta-estradiol and testosterone on the contractile responses of porcine coronary arteries. **British journal of pharmacology**, v. 129, n. 7, p. 1301–8, 2000.

TEP-AREENAN, P.; KENDALL, D. A.; RANDALL, M. D. Testosterone-induced vasorelaxation in the rat mesenteric arterial bed is mediated predominantly via potassium channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, n. 3, p. 735–740, 2002.

TOHRU FUKAI, RODNEY J FOLZ, ULF LANDMESSER, D. G. H. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. **Cardiovascular Research**, v.

55, n. 2, p. 239–249, 2002.

TOOT, J. D. et al. Testosterone increases myogenic reactivity of second-order mesenteric arteries in both defective and normal androgen receptor adult male rats. **Gender medicine**, v. 8, n. 1, p. 40–52, 2011.

TOOT, J. D. et al. Alterations in vasomotor systems and mechanics of resistance-sized mesenteric arteries from SHR and WKY male rats following in vivo testosterone manipulation. **Biology of Sex Differences**, v. 3, n. 1, p. 1, 2012.

TOSTES, R. C. et al. Reactive oxygen species: players in the cardiovascular effects of testosterone. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 310, n. 1, p. R1–R14, 2016.

TRAISH, A. M. Adverse health effects of testosterone deficiency (TD) in men. **Steroids**, v. 88, p. 106–116, 2014.

TRAISH, A. M.; GALOOSIAN, A. Androgens modulate endothelial function and endothelial progenitor cells in erectile physiology. **Korean journal of urology**, v. 54, n. 11, p. 721–31, 2013.

TYAGI, V. et al. Revisiting the role of testosterone: Are we missing something? **Reviews in urology**, v. 19, n. 1, p. 16–24, 2017.

UNGVARI, Z. et al. Increased mitochondrial H₂O₂ production promotes endothelial NF- κ B activation in aged rat arteries. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 293, n. 1, 2007.

UNGVARI, Z. et al. Mechanisms of vascular aging. **Circulation Research**, v. 123, n. 7, p. 849–867, 2018.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VAN DEN BELD, A. W. et al. Endogenous Hormones and Carotid Atherosclerosis in Elderly Men. **American Journal of Epidemiology**, v. 157, n. 1, p. 25–31, 2003.

VAN DER LOO, B. et al. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. **Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 12, p. 1731–1743, 2000.

WANG, H. et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet**, v. 388, n. 10053, p. 1459–1544, 2016.

WELLENDORPH, P.; BRÄUNER-OSBORNE, H. Molecular cloning, expression, and sequence analysis of GPRC6A, a novel family C G-protein-coupled receptor. **Gene**, v. 335, p. 37–46, 2004.

WEN, Q.; CHENG, C. Y.; LIU, Y. X. Development, function and fate of fetal Leydig cells. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 59, p. 89–98, 2016.

WHITE, R.; SELLERS, M.; STALLONE, J. Testosterone-induced vasorelaxation of rat mesenteric microvasculature is neuronal nitric oxide synthase-dependent but androgen receptor-independent. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 1, 2008.

WILLIAMS, M. R. I. et al. Dehydroepiandrosterone increases endothelial cell proliferation in vitro and improves endothelial function in vivo by mechanisms independent of androgen and estrogen receptors. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 89, n. 9, p. 4708–15, 2004.

WILSON, C. M.; MCPHAUL, M. J. A and B forms of the androgen receptor are present in human genital skin fibroblasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 4, p. 1234–8, 1994.

WILSON, C. M.; MCPHAUL, M. J. A and B forms of the androgen receptor are

expressed in a variety of human tissues. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 120, n. 1, p. 51–57, 1996.

WINTERS, S. J.; TAKAHASHI, J.; TROEN, P. Secretion of Testosterone and Its $\Delta 4$ Precursor Steroids into Spermatic Vein Blood in Men with Varicocele-Associated Infertility. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 84, n. 3, p. 997–1001, 1999.

WOODWARD, C. J. H. A re-evaluation of the anabolic effect of testosterone in rats: Interactions with gonadectomy, adrenalectomy and hypophysectomy. **Acta Endocrinologica**, v. 128, n. 5, p. 473–477, 1993.

WU, F. C. W.; VON ECKARDSTEIN, A. Androgens and Coronary Artery Disease. **Endocrine Reviews**, v. 24, n. 2, p. 183–217, 2003.

XIMENES, C. F. et al. Tributyltin chloride disrupts aortic vascular reactivity and increases reactive oxygen species production in female rats. **Environmental science and pollution research international**, v. 24, n. 31, p. 24509–24520, 2017.

XU, X.; PERGOLA, G. DE; BJORNTORP, P. The effects of androgens on the regulation of lipolysis in adipose precursor cells. **Endocrinology**, v. 126, n. 2, p. 1229–1234, 1990.

YANG, Y. M. et al. eNOS uncoupling and endothelial dysfunction in aged vessels. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 297, n. 5, 2009.

YILDIZ, O. Vascular smooth muscle and endothelial functions in aging. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1100, p. 353–360, 2007.

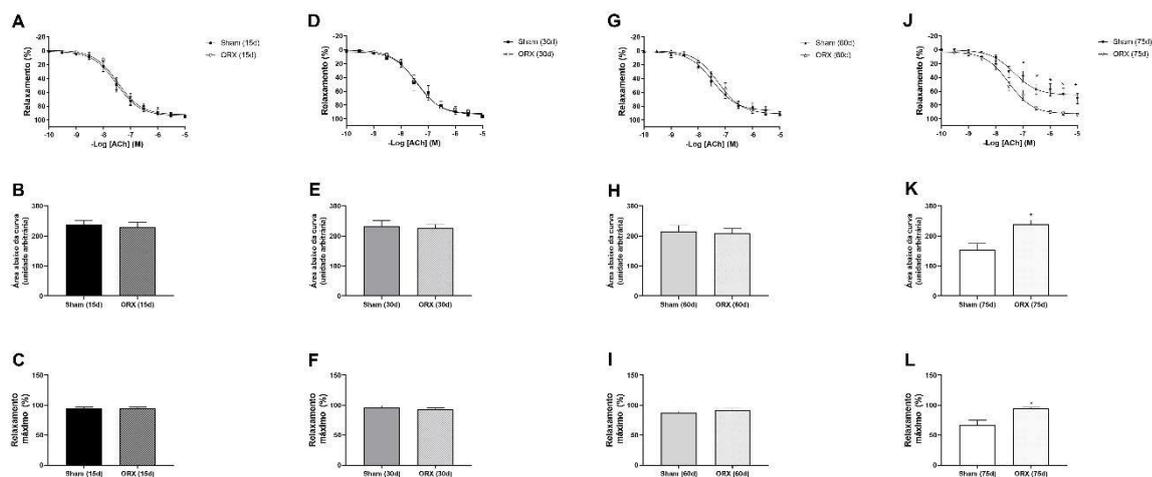
YU, J. et al. Androgen receptor-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells: role of phosphatidylinositol 3-kinase/akt pathway. **Endocrinology**, v. 151, n. 4, p. 1822–8, 2010.

ZHOU, P. et al. Testosterone deprivation by castration impairs expression of voltage-dependent potassium channels in rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 593, n. 1–3, p. 87–91, 2008.

ZOU, M.-H.; SHI, C.; COHEN, R. A. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. **Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 6, p. 817–826, 2002.

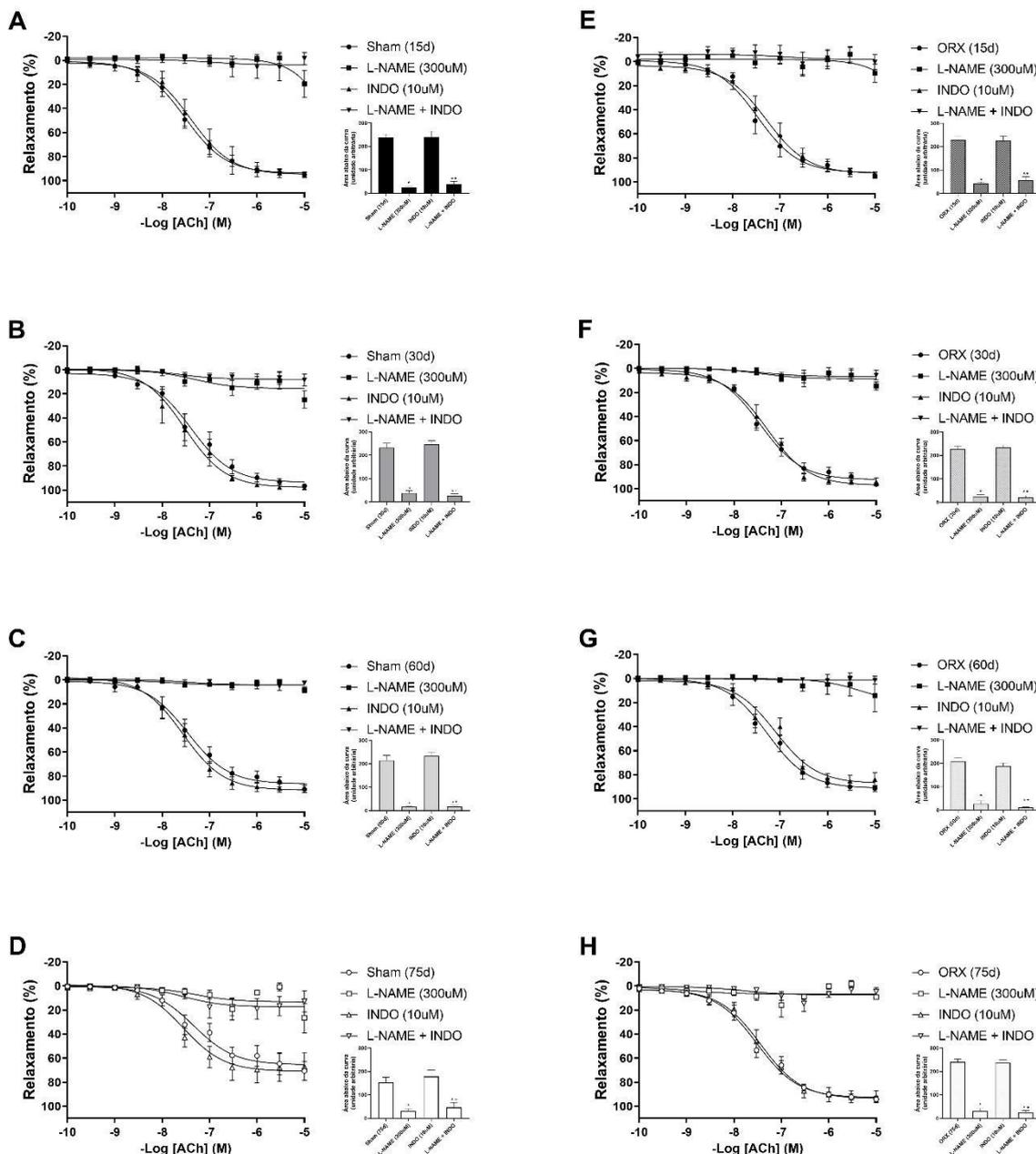
APÊNDICES

APÊNDICE A - REATIVIDADE VASCULAR À ACETILCOLINA EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE TERCEIRA ORDEM DE RATOS WISTAR SHAM E ORQUIECTOMIZADOS (ORX)



Curva concentração-resposta à acetilcolina (ACh, 10^{-10} M - 10^{-5} M), nos grupos Sham e ORX-15d (A, B e C), Sham e ORX-30d (D, E e F), Sham e ORX-60d (G, H e I) e Sham e ORX-75d (J, K e L). Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo *Bonferroni post hoc test*. * $p > 0,05$ comparado com seu respectivo grupo Sham. $n=7$ para cada grupo.

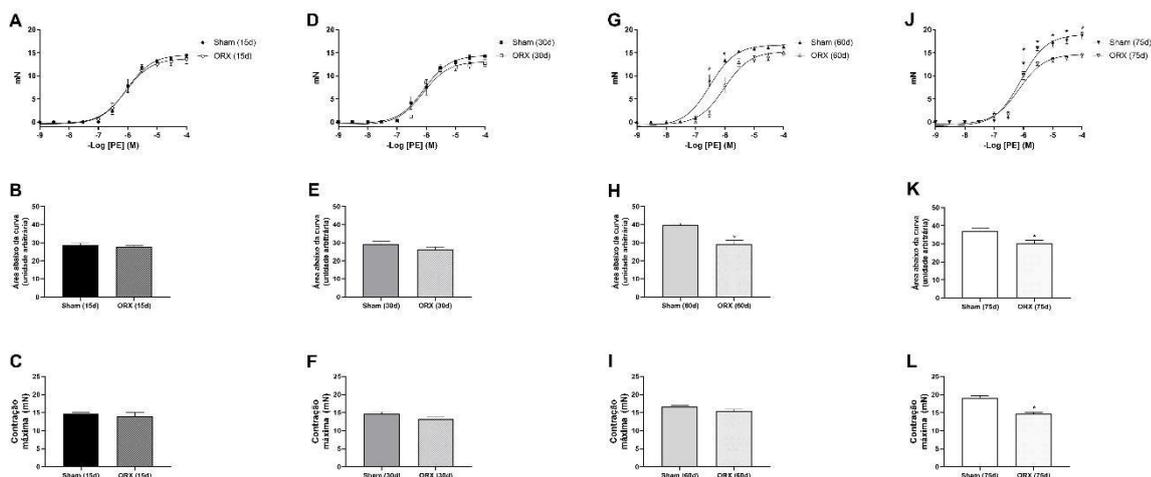
APÊNDICE B - PARTICIPAÇÃO DOS MEDIADORES ENDOTELIAIS NA CURVA CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA À ACETILCOLINA (ACh, 10^{-10} M - 10^{-5} M) EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE TERCEIRA ORDEM DE RATOS WISTAR SHAM E ORQUIECTOMIZADO (ORX) APÓS 15, 30, 60 E 75 DIAS DE CIRURGIA.



Efeito da inibição da ciclooxigenase (COX) com indometacina (INDO, 10 μ M), óxido nítrico sintase (NOS) com N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 300 μ M), e inibição combinada da COX e NOS com L-NAME + INDO em: (A) Sham e (E) ORX-15d (n=6-8), (B) Sham e (F) ORX-30d (n=5-7), (C) Sham e (G) ORX-60d (n=6-7) e (D) Sham e (H) ORX-75d (n=6-8). Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada por meio da análise de

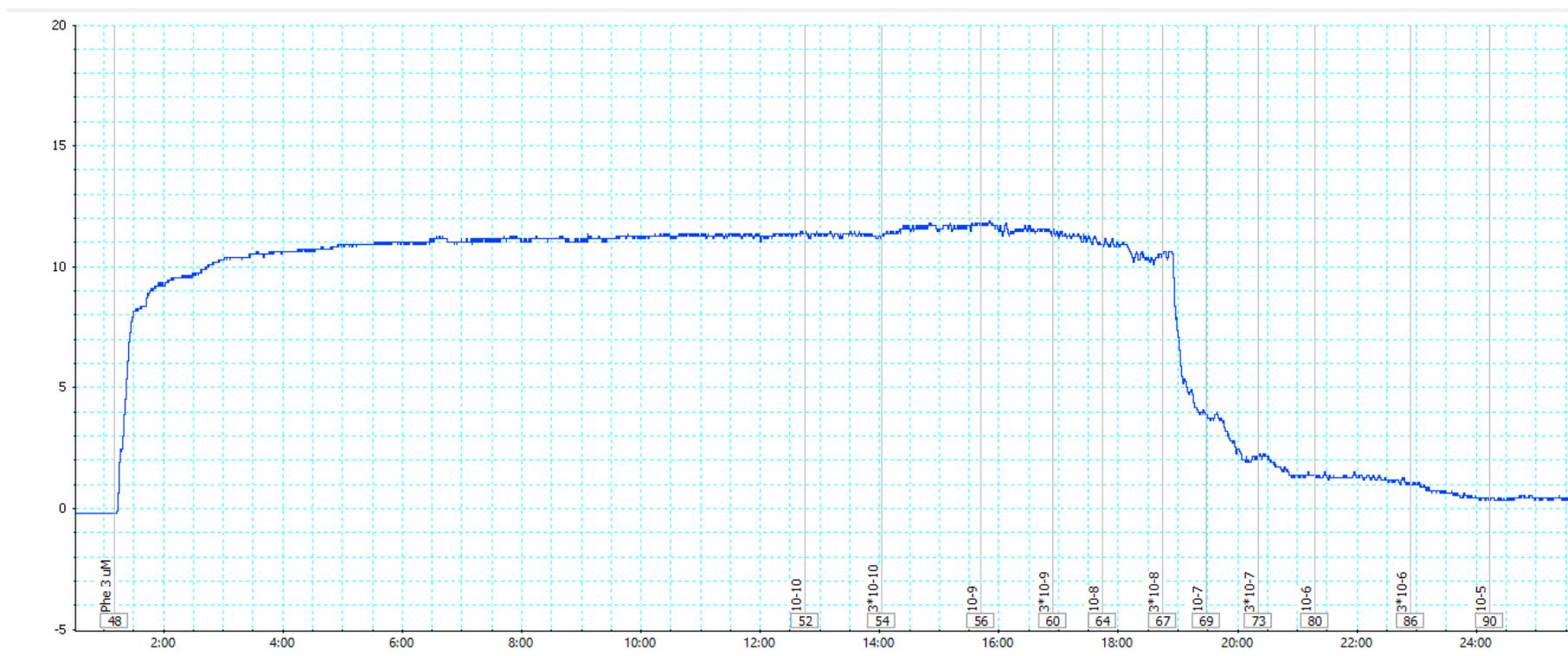
variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo *Bonferroni post hoc test*. * $p > 0,05$ comparado com seu respectivo grupo Sham e * $p > 0,05$ comparado com seu respectivo grupo INDO

APÊNDICE C - REATIVIDADE VASCULAR À FENILEFRINA EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE TERCEIRA ORDEM DE RATOS WISTAR SHAM E ORQUIECTOMIZADOS (ORX)

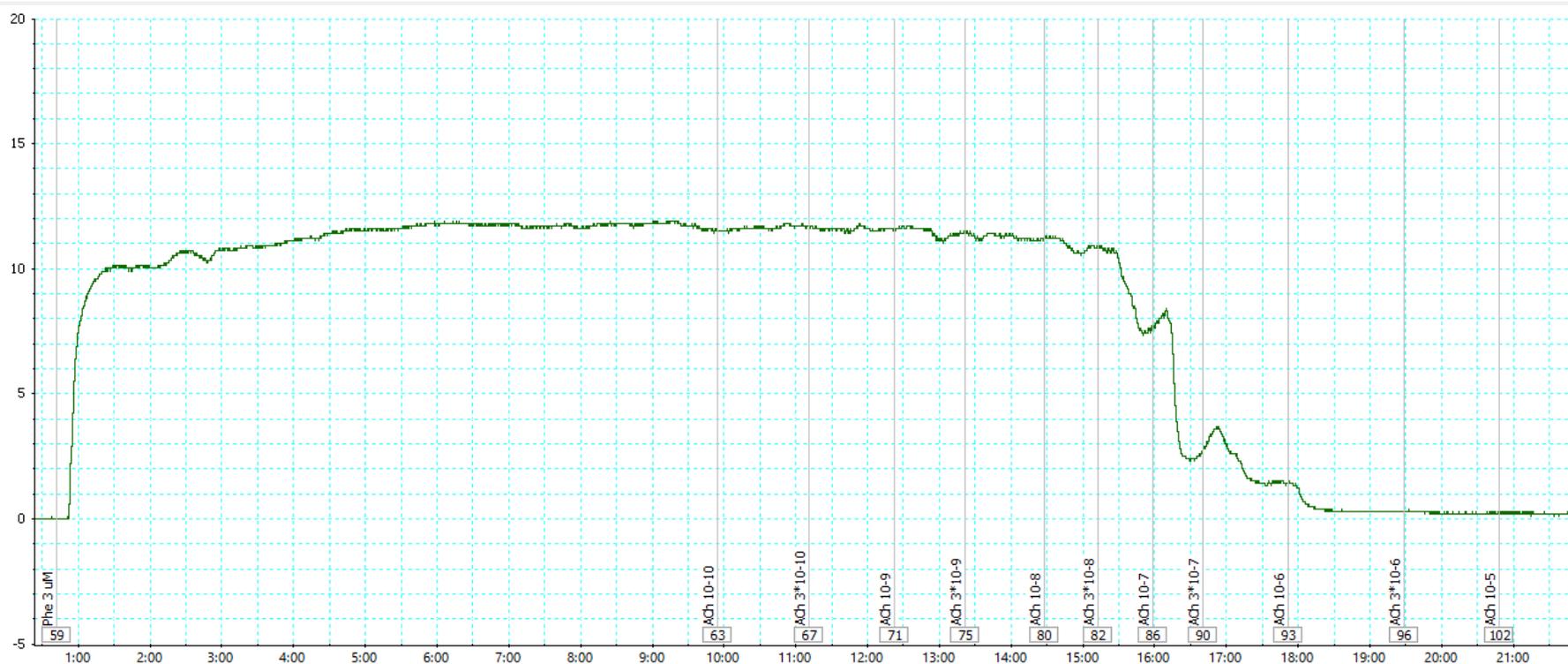


Curva concentração-resposta à fenilefrina (PE, 10^{-9} M - 10^{-4} M), nos grupos Sham e ORX-15d (A, B e C, $n=6-7$), Sham e ORX-30d (D, E e F, $n=6-7$), Sham e ORX-60d (G, H e I, $n=6$) e Sham e ORX-75d (J, K e L, $n=6$). Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo *Bonferroni post hoc test*. * $p>0,05$ comparado com seu respectivo grupo Sham.

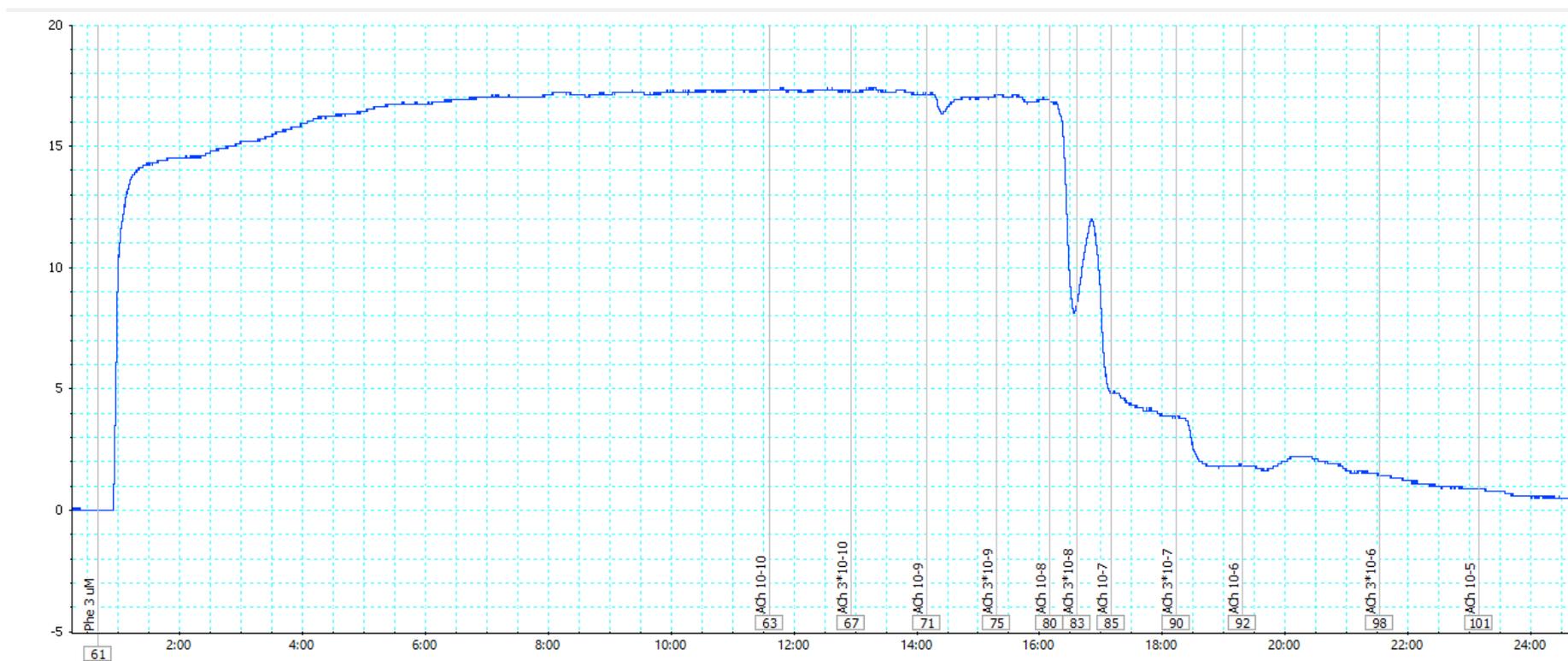
APÊNDICE D - REGISTRO TÍPICO DA REATIVIDADE VASCULAR À ACETILCOLINA EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE TERCEIRA ORDEM DE RATOS WISTAR SHAM-15d



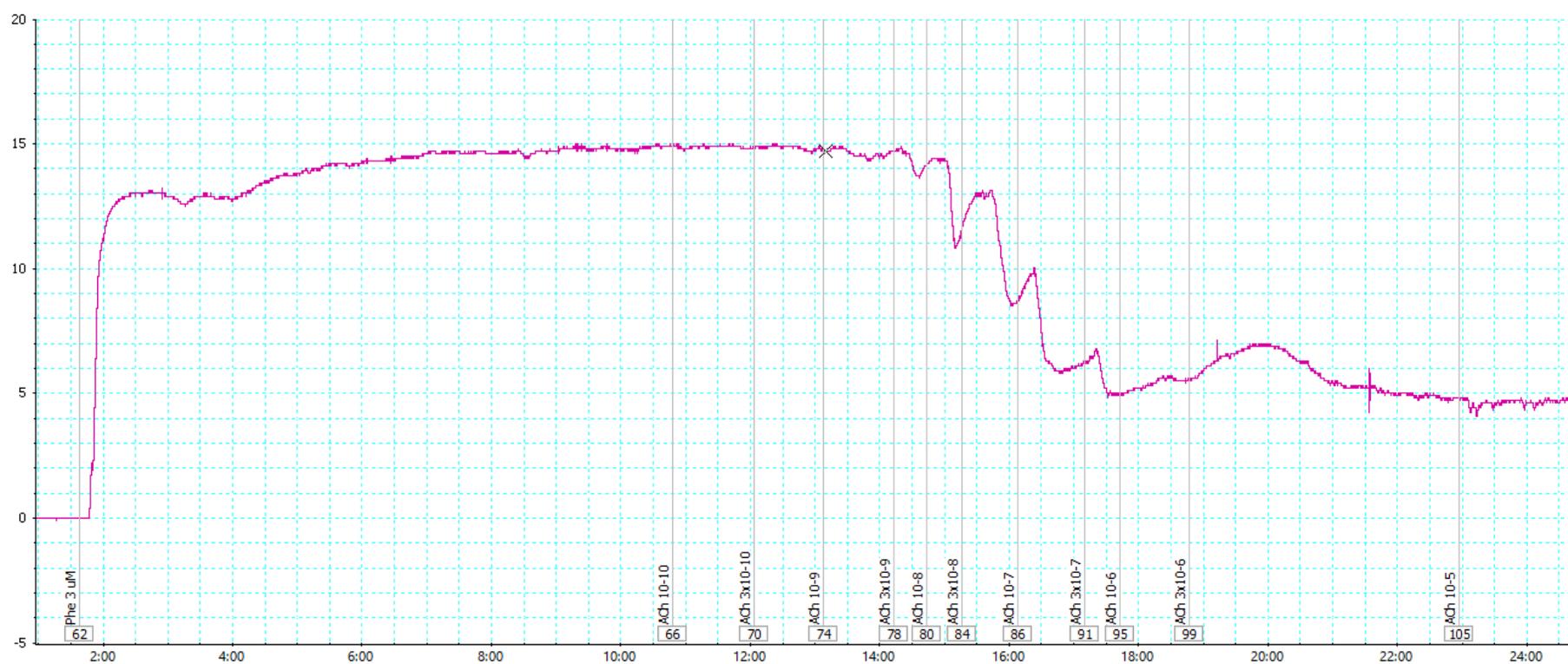
APÊNDICE E - REGISTRO TÍPICO DA REATIVIDADE VASCULAR À ACETILCOLINA EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE TERCEIRA ORDEM DE RATOS WISTAR SHAM-30d



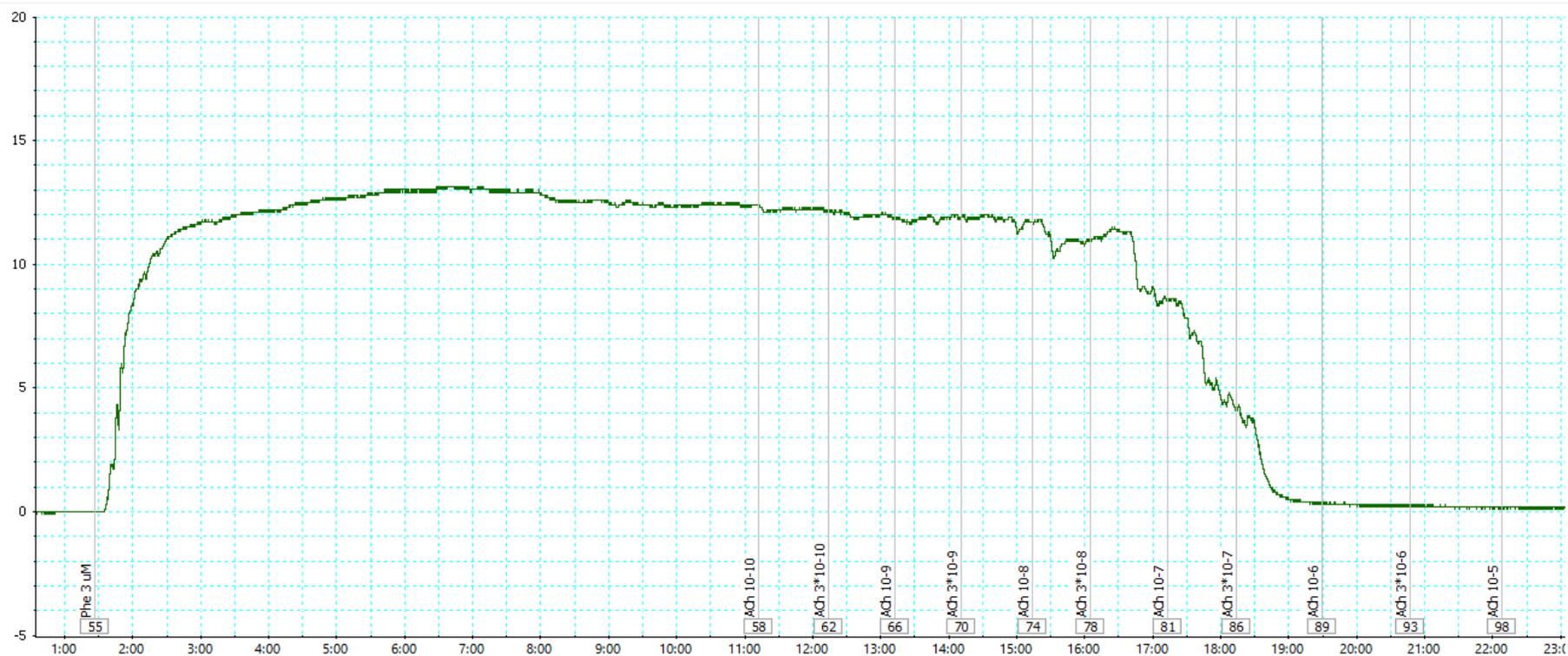
APÊNDICE F - REGISTRO TÍPICO DA REATIVIDADE VASCULAR À ACETILCOLINA EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE TERCEIRA ORDEM DE RATOS WISTAR SHAM-60d



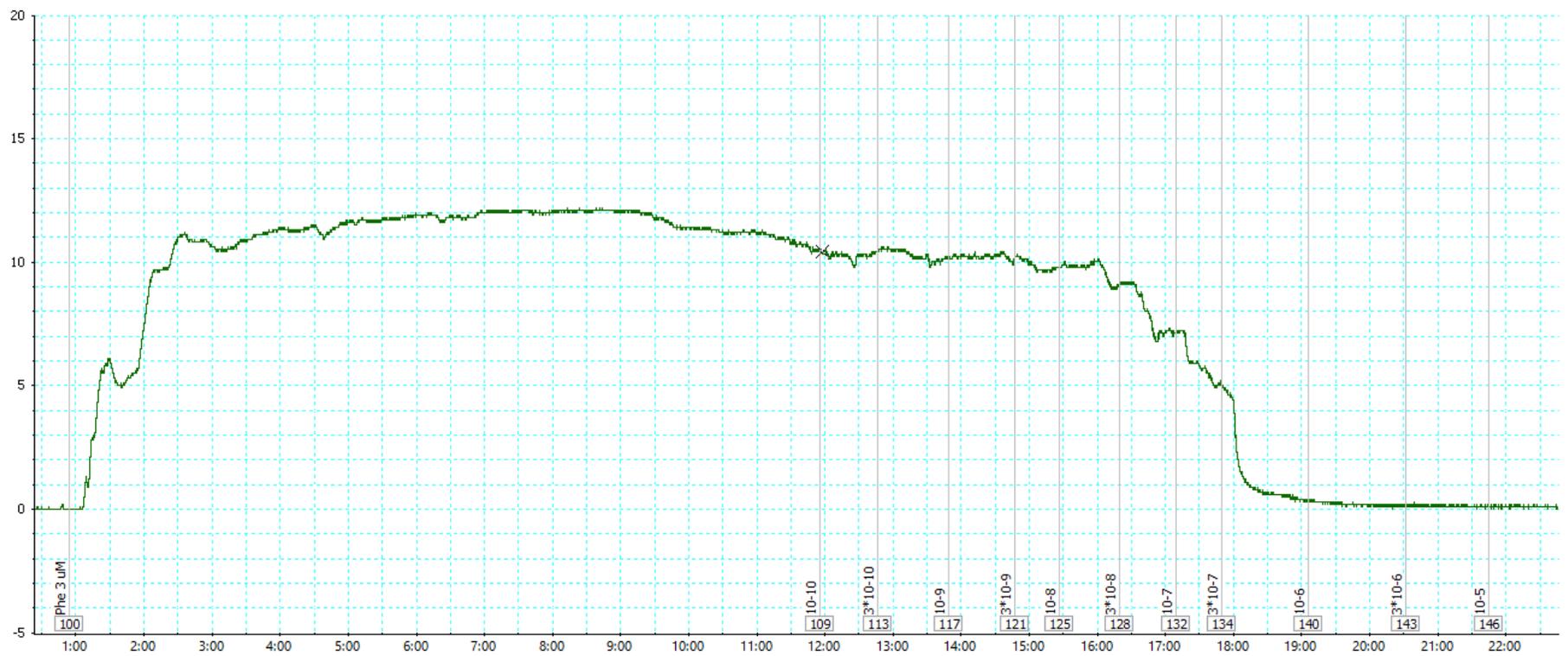
APÊNDICE G - REGISTRO TÍPICO DA REATIVIDADE VASCULAR À ACETILCOLINA EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE TERCEIRA ORDEM DE RATOS WISTAR SHAM-75d



APÊNDICE H - REGISTRO TÍPICO DA REATIVIDADE VASCULAR À ACETILCOLINA EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE TERCEIRA ORDEM DE RATOS WISTAR ORX-15d



APÊNDICE I - REGISTRO TÍPICO DA REATIVIDADE VASCULAR À ACETILCOLINA EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE TERCEIRA ORDEM DE RATOS WISTAR ORX-30d



APÊNDICE J - REGISTRO TÍPICO DA REATIVIDADE VASCULAR À ACETILCOLINA EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE TERCEIRA ORDEM DE RATOS WISTAR ORX-60d



APÊNDICE K - REGISTRO TÍPICO DA REATIVIDADE VASCULAR À ACETILCOLINA EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE TERCEIRA ORDEM DE RATOS WISTAR ORX-75d

