

**A PRIVAÇÃO ANDROGÊNICA DE LONGO PRAZO
MODULA A REATIVIDADE VASCULAR POR VIAS DEPENDENTES DE
ALDOSTERONA E ANGIOTENSINA II**

Anna Karolina Nascimento Costa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
Laboratório de Eletromecânica Cardíaca e Reatividade Vascular

VITÓRIA - 2022

**A PRIVAÇÃO ANDROGÊNICA DE LONGO PRAZO
MODULA A REATIVIDADE VASCULAR POR VIAS DEPENDENTES DE
ALDOSTERONA E ANGIOTENSINA II**

Anna Karolina Nascimento Costa

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Ivanita Stefanon

Co-Orientador: Dr. Rogerio Faustino Ribeiro Junior

Prof^a. Dr^a. Ivanita Stefanon – Orientadora, PPGCF-UFES

Prof. Dr. Rogério Faustino Ribeiro Júnior – Co-orientador

Prof^a. Dr^a. Nazaré Souza Bissoli - UFES

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Couto Davel - UNICAMP

Coordenadora do PPGCF: Prof^a. Dr^a Silvana dos Santos Meyrelles

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
VITÓRIA, 2022

No estudo nos debruçamos sobre discursos que não são nossos. Porque outras pessoas resolveram registrar o que de melhor passou por suas cabeças. E graças a essa iniciativa, compartilhamos seus pensamentos. O estudo nunca se reduz a mera apropriação do que é estudado, seja porque nosso repertório não dispõe de ganchos para atribuir-lhe qualquer sentido, passando longe de nossa compreensão. Seja porque – na abordagem desse novo discurso pelo nosso repertório – nos surgem conjecturas, hipóteses, discordâncias e convicções. Dessa forma, todo estudo pode se converter em conhecimento. O despertar inspirado – Clóvis de Barros Filho e Monja Coen

AGRADECIMENTOS

Ao pesquisador Dr. Rogério Faustino Ribeiro Júnior, por sua sempre elegante digital científica neste desenho experimental do qual é o criador e mentor intelectual. Meu muito obrigada por me abrir as portas da ciência quando me recebeu pela primeira vez naquela sala e me oportunizou a entrada no Laboratório de Eletromecânica Cardíaca e Reatividade Vascular; jamais esquecerei suas palavras naquele dia. Me deu esperança de que mesmo sem ter o perfil científico que eu cria ser necessário, eu poderia ser uma pesquisadora se quisesse.

Meus agradecimentos à minha orientadora Ivanita Stefanon por sua compreensão do ser humano em as suas facetas; por entender que cada pesquisador é antes de tudo uma pessoa com limitações e defeitos, e por sem dúvida elevar esta pessoa ao estado de acreditar em si mesma, mesmo quando nós desacreditamos de nossas capacidades; e por ensinar-nos paciência, deixando claro que o cientista não se forma em pouco tempo, e que ser cientista tem também haver com nunca parar de fazer perguntas, nunca se cansar de descobrir. As palavras nunca poderão descrever meu sentimento de agradecimento pelo apoio incondicional sem o qual literalmente eu não teria conseguido chegar à defesa.

À minha mãe Aidê Leal, por nunca ter medido esforços reais e inimagináveis para manter a minha educação e formação profissional; ela talvez nunca entenda a dimensão do que fez por mim e minha irmã, já que para ela é o natural a fazer. Ela é, e sempre será assim. Nós sabemos o que você fez e faz por nós minha mãe querida. Todo meu amor a você e espero um dia retribuir à altura. E ao meu pai Wilton Santos Costa por ter nos ensinado muito cedo, tão cedo quanto é possível uma criança perceber, o valor do conhecimento e a paixão pelos livros e pelo saber em geral. Obrigada por nos mostrar o mundo com os olhos do conhecimento.

À minha esposa Desirée, pelo incentivo, suporte, no real sentido da palavra. Suporte nas ausências, nas presenças cansadas, nos dias em que eu achava que não seria possível e por me fazer acreditar antes de todos que isto realmente seria possível de acontecer. Obrigada pelo amor e admiração presentes em nossa rotina diária. Neoqueav.

À minha irmã Dr^a Fanny Nasciemnto Costa, da qual tenho o maior orgulho de chamar de irmã. Apesar de ser mais nova, ela é também meu modelo de cientista. Em muitos momentos de nossa vida, sempre foi mais corajosa para os desafios; sempre me falava a verdade quando outros não queriam ou não podiam e também me fez acreditar que seria possível em muitos momentos de nossas vidas. Amo você feiosinha!

Meus agradecimentos aos meus colegas do LEMC, todos, por me ajudar e apoiar em cada pedacinho desta jornada até aqui. Mas um agradecimento especial à minha parceira mais próxima, Michele Hortelan, pelo auxílio em todas as etapas desta pesquisa; desde cuidados com animais até suporte emocional; e ao colega de várias horas de experimento Vilmar Zanh. À Tati, Ingridy, Rakel e Evelyn por me ajudarem a aprender a reatividade vascular no aparato da aorta. Renata pela grande ajuda na execução do método de medida do TBARS. Ao Dr. Anderson que me ensinou os prazeres e percalços envolvidos na vida dentro de um laboratório de ciências fisiológicas. Meus agradecimentos aos professores doutores Aurélia Fernandes pela parceria fundamental; Leonardo, Dalton e Alessandra pelas orientações sempre pertinentes.

Meus agradecimentos à Dr^a Ana Paula Couto Davel pela colaboração científica neste projeto.

Enfim agradeço a todos que contribuíram para que este trabalho estivesse pronto hoje, e mais ainda aos que contribuíram e contribuem para que esta pesquisadora um dia esteja pronta. À vocês meu muito obrigada e compreensão que as palavras não foram capazes de traduzir os agradecimentos que minha mente conjecturou.

Apoio Financeiro

Meus agradecimentos às agências de fomento à pesquisa FAPES (Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo apoio financeiro essencial para que esta pesquisa se concretizasse, principalmente através do projeto de pesquisa PRONEX-FAPES edital 24/2018 – Processo 84324600/2018.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	6
1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Testosterona	21
1.1.1 Histórico.....	21
1.1.2 Mecanismos de síntese, armazenamento e transporte da testosterona	22
1.1.3 Interação da testosterona com o sistema cardiovascular	24
1.1.4 Interação da testosterona e do sistema vascular.....	25
Receptores vasculares para testosterona	36
1.1.5 Hipótese	40
2 JUSTIFICATIVA	40
3 OBJETIVOS	40
3.1 OBJETIVO GERAL	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
• Investigar se a castração modula a resposta vascular em anéis de aorta de ratos wistar;.....	41
• Avaliar a resposta vascular mediada por angiotensina II (via receptores AT1), aldosterona e estresse oxidativo (pela via da NADPH oxidase) em anéis de aorta de ratos wistar;.....	41
• Identificar se os níveis de malondialdeído (MDA) em plasma sanguíneo de ratos wistar foram alterados pela castração;.....	41
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	41
4.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	41
4.3 MODELO EXPERIMENTAL	42
4.3.1 Procedimento cirúrgico	42
4.3.3. Intervenções agudas.....	43
4.3.4. Isolamento de anéis de aorta	43

5	RESULTADOS.....	48
	Dados ponderais.....	48
6	DISCUSSÃO	66
7	REFERÊNCIAS.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Peso corporal.....	48
Tabela 2 - Efeito do tratamento crônico com apocinina (APO), espironolactona (SPI) e losartan (LOS) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar machos orquidectomizados (OQT) e não castrados/orquidectomizados (SHAM).....	49
Tabela 3 - Efeito das intervenções agudas in vitro com Losartan (LOS), indometacina (INDO), denudação do endotélio (E-) e manutenção da gordura perivascular (PVAT) à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar machos orquidectomizados (OQT) e não castrados (SHAM).	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama das vias da esteroidogênese humana (HÄGGSTRÖM; RICHFIELD, 2014)	24
Figura 2 – Diagrama estrutural de artéria muscular de médio calibre. Fonte: criado em LifeART Collection Images.....	26
Figura 3– Regulação dependente de Ca^{2+} da contração do MLV. Vasoconstritores induzem a contração do MLV pelo aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} . Peptídeos vasoativos, assim como Angiotensina II, liga-se ao receptor acoplado à proteína G (GPCRs, do inglês G protein-coupled receptors) ativam a fosfolipase C (PLC) levando à (i) produção de IP_3 e (ii) formação de diacilglicerol (DAG). IP_3 liga-se ao receptor IP no canal de Ca^{2+} (InsP3R) e induz a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (SR, do inglês sarcoplasmic reticulum). DAG causa a ativação da proteína cinase C (PKC), que influencia os canais de Ca^{2+} , assim como os SOC (do inglês, store-operated Ca^{2+} channel) ou canal de cálcio operados por estoque; SMOG (do inglês, second messenger-operated Ca^{2+} channel) ou canal de cálcio operado por segundos mensageiros; canal de cálcio operado por voltagem (VOC, do inglês voltage-gated Ca^{2+} channel) e o trocador Na^+-Ca^{2+} (NCX, do inglês, Na^+-Ca^{2+} exchanger). A PKC também estimula a atividade do receptor de rianodina do canal de cálcio (RyR) induzindo a liberação do Ca^{2+} do SR. A atividade da MLCP (Fosfatase das cadeias leves de miosina) pode ser reduzida pela fosforilação da CPI-17. Ca^{2+} se liga à calmodulina e ativa a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK do inglês, myosin light chain kinase), levando à fosforilação da Ser19, polimerização da actina, e contração vascular (TOUYZ et al., 2018).....	29
Figura 4 Potenciais mecanismos pelos quais a testosterona influencia a reatividade vascular. Os mecanismos de testosterona independentes do endotélio são considerados como ocorrendo principalmente através da inibição de canais Ca^{2+} operados por voltagem (VOCCs) e/ou ativação de canais K^+ (KCs) em células musculares lisas (SMCs). A testosterona partilha o mesmo sítio de ligação molecular que a nifedipina na subunidade $\alpha 1-C$ dos canais Ca^{2+} tipo L para causar bloqueio dos canais em concentrações fisiológicas, restringindo assim o influxo de Ca^{2+} e induzindo vasodilatação (1). Alguns estudos sugerem que as concentrações farmacológicas de testosterona podem ativar a abertura dos canais de Ca^{2+} e induzir	

vasoconstrição através do aumento do influxo de Ca^{2+} . Em alternativa, a testosterona ativa os canais de K^{+} operados por voltagem e/ou grande condutância, canais de K^{+} ativados por Ca^{2+} , aumentando o efluxo intracelular de K^{+} para induzir hiperpolarização e subsequente relaxamento (2). A testosterona também pode inibir o influxo intracelular de Ca^{2+} através de canais de Ca^{2+} ativados em loja (SOCCs), bloqueando a resposta à prostaglandina $\text{F}_2\alpha$ ($\text{PGF}_2\alpha$) (3). As ações dependentes do endotélio da testosterona podem ser efeitos genómicos e não genómicos a longo prazo. A testosterona aumenta a expressão da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e aumenta a produção de óxido nítrico (NO) (4). Se estas ações são através da ligação direta dos receptores de androgênio, a aromatização à ativação dos receptores de estradiol e estrogênio, ou a interação com vias alternativas de sinalização intracelular permanece desconhecida. Além disso, foi demonstrado que o tratamento com testosterona aumenta a atividade de eNOS, aumentando potencialmente a fosforilação através da ativação não-genômica das vias de sinalização intracelular e do influxo de Ca^{2+} (5). O aumento do NO atua sobre os SMC para induzir relaxamento ativando o GMPc , que por sua vez ativa as quinases protéicas dependentes de GMPc (PKG) (6). PKG fosforilatos e ativa o retículo sarcoplasmático Ca^{2+} -ATPase (SERCA), que aumenta a absorção de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático superficial (SR) e, portanto, diminui o Ca^{2+} global da célula. A PKG também aumenta a liberação de Ca^{2+} no espaço submembrana onde a ativação dos canais K^{+} se segue e o PKG pode inibir adicionalmente a atividade dos canais de Ca^{2+} diretamente para causar relaxamento. T, testosterona (KELLY; JONES, 2013)38

Figura 5- Esquema das vias de sinalização extra-nuclear ativadas por testosterona (SUKOCHEVA, 2015). Apresentação esquemática dos caminhos de sinalização extra-nuclear ativados por testosterona. A testosterona se liga ao (s) receptor(es) androgênico(s) associado(s) a membrana não definida(s) (mAR) que pode(m) transduzir a sinalização a jusante para a fosfolipase c (PLC). A ativação do PLC produz vários segundos mensageiros, incluindo $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (IP_3) e DAG. Ca^{2+} leva então a um aumento do fluxo intracelular de Ca^{2+} . Alternativamente, no caminho ERK, a Testosterona se liga ao receptor associado à membrana, que se associa e ativa a Src kinase. Em um terceiro mecanismo proposto, SHBG-AR GPCR ativa Ras, que por sua vez ativa a cascata de fosforilação. O ERK via fosforilatos CREB para modular a expressão gênica. AR: receptor de androgênio associado à membrana; CREB:

proteína de ligação do elemento de resposta cAMP; DAG: diacilglicerol; GPCR: G-protein-coupled receptor; IP3: Inositol trisfosfato; PLC: Fosfolipase C; SRC: Src kinase; RAS: Proteína RasGTPase; +: Indica efeito positivo na ativação.39

Figura 6– Aorta torácica de ratos wistar antes de ser seccionada em anéis; Fonte: arquivo pessoal. Foto: Michele Hortelan44

Figura 7– Anéis isolados de aorta de ratos tratados: preparação dos anéis para avaliação da reatividade vascular in vitro no Sistema de aquisição de dados. Fonte: Modificado de Simões, 2019. (SIMÕES, 2019)45

Figura 8- Ganho de peso corporal dos animais após 12 semanas de tratamento; valores apresentados como média \pm SEM; n=número de animais; SHAM, ratos não castrados (vermelho); OQT ratos orquidectomizados (azul); SHAM+Apo, ratos não castrados tratados com apocinina; OQT+APO, ratos orquidectomizados tratados com apocinina; SHAM+LOS, ratos não castrados tratados com losartan; OQT+LOS, ratos orquidectomizados tratados com losartan; SHAM+Spi, ratos não castrados tratados com espironolactona; OQT+Spi, ratos orquidectomizados tratados com espironolactona; significância foi avaliada usando teste T de student's não paramétrico; * $p < 0,05$ SHAM vs. OQT.49

Figura 9- Curva de contração à fenilefrina (% de contração ao KCl 75mM) em anéis de aorta mantidos com endotélio e sem endotélio (E-), incubados com L-Name (LN) e incubados com Indometacina (INDO); valores apresentados como média \pm SEM; n=número de animais; SHAM, ratos não castrados; OQT, ratos orquidectomizados; SHAM E-, anéis sem endotélio; OQT E-, ratos orquidectomizados anéis sem endotélio; SHAM LN, anéis de aorta de ratos não castrados incubados com LN; OQT LN, anéis de aorta de ratos castrados incubados com LN; SHAM INDO, , anéis de aorta de ratos não castrados incubados com indometacina; OQT INDO, anéis de aorta de ratos castrados incubados com indometacina.51

Figura 10- Curva concentração-resposta à fenilefrina em animais tratados por 12 semanas. Animais tratados com losartan (LOS), apocinina (APO) e espironolactona (SPI) nos grupos SHAM (A) e OQT (B). Valores apresentados como média \pm SEM; n=número de animais.* $p < 0,05$ vs. OQT. test t Student.52

Figura 11- Curva concentração-resposta à fenilefrina em animais tratados por 12 semanas com losartan. OQT: ratos castrados controle; SHAM: ratos não castrados

controle; SHAM+LOS: ratos não castrados tratados com losartan; OQT+LOS: ratos castrados tratados com losartan. Valores apresentados como média ± SEM; n=número de animais. * p<0,05. Test t Student.	53
Figura 12- Curva concentração-resposta à fenilefrina em animais tratados por 12 semanas com apocinina; OQT: ratos castrados controle; SHAM: ratos não castrados controle; SHAM+APO: ratos não castrados tratados com apocinina; OQT+APO: ratos castrados tratados com apocinina; valores apresentados como média ± SEM; n=número de animais test t Student.	54
Figura 13- Medida de MDA (nMol/mL) plasmático; OQT (Azul) : SHAM (Vermelho):SHAM + LOS (Hachurado vermelho): ratos tratados com losartan e OQT + LOS (Hachurado azul). Valores apresentados como média ± SEM. Não houve diferença entre os grupos.	55
Figura 14- Curva concentração-resposta à fenilefrina em animais tratados com espironolactona (% de contração ao KCl 75mM); valores apresentados como média ± SEM; n=número de animais; SHAM, ratos não castrados controle; OQT, ratos orquidectomizados controle; SHAM+Spi, ratos não castrados tratados com espironolactona; OQT+Spi, ratos orquidectomizados tratados com espironolactona; CT grupo controle. * p<0,05.	55
Figura 15- Curva concentração-resposta à fenilefrina grupo controle – Intervenções agudas; SHAM CT, ratos não castrados controle; SHAM INDO, ratos não castrados incubados com indometacina; SHAM E-: ratos não castrados anéis sem endotélio; SHAM L-NAME: ratos não castrados anéis incubados com L-NAME; OQT CT, ratos orquidectomizados controle; OQT INDO, ratos castrados incubados com indometacina; OQT E-: ratos castrados anéis sem endotélio; OQT L-NAME: ratos castrados anéis incubados com L-NAME.	56
Figura 16 - Curva concentração-resposta à fenilefrina em animais tratados cronicamente com espironolactona e incubados com L-NAME; valores apresentados como média ± SEM; n=número de animais * p<0,05 test t Student.	58
Figura 17- Curva concentração-resposta à fenilefrina em animais tratados cronicamente com espironolactona e anéis sem endotélio; valores apresentados como média ± SEM; n=número de animais * p<0,05 test t Student.	59

Figura 18- Curva concentração-resposta à fenilefrina em animais tratados cronicamente com espironolactona e anéis incubados com indometacina; valores apresentados como média ± SEM; n=número de animais * p<0,05 test t Student....	60
Figura 19- Curva concentração-resposta à fenilefrina em animais tratados durante 12 semanas com losartan em anéis isolados de aorta incubados com L-NAME; valores apresentados como média ± SEM; n=número de animais * p<0,05 test t Student....	61
Figura 20- Curva concentração-resposta à fenilefrina em animais tratados por 12 semanas com losartan e anéis isolados de aorta sem endotélio; valores apresentados como média ± SEM; n=número de animais * p<0,05 test t Student.	62
Figura 21 - Curva concentração-resposta à fenilefrina em animais tratados por 12 semanas com losartan em anéis isolados de aorta incubados com indometacina. Valores apresentados como média ± SEM; n=número de animais * p<0,05 test t Student. A potência foi maior no grupo OQT+LOS comparado com o grupo SHAM+LOS (A) *p<0.05. Esta diferença desapareceu na presença de inibição da COX, com indometacina (B).....	63
Figura 22 - Curva concentração-resposta à fenilefrina em animais tratados por 12 semanas com apocinina e anéis isolados de aorta incubados com L-NAME. Valores apresentados como média ± SEM; n=número de animais * p<0,05 test t Student....	64
Figura 23- Curva concentração-resposta à fenilefrina em animais tratados por 12 semanas com apocinina em anéis isolados de aorta sem endotélio. Valores apresentados como média ± SEM; n=número de animais * p<0,05 test t Student....	65
Figura 24- Curva concentração-resposta à fenilefrina em animais tratados por 12 semanas com apocinina em anéis isolados de aorta incubados com indometacina. Valores apresentados como média ± SEM; n=número de animais * p<0,05 test t Student.....	66

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

Acetilcolina (ACh)
Adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH)
Ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$)
Ciclooxigenase (COX)
Ciclooxigenase-1 (COX-1)
Ciclooxigenase-2 (COX-2)
Cloreto de potássio (KCl)
Diferença da área abaixo da curva (dAUC)
Doenças Cardiovasculares (DCV's)
Endotélio íntegro (E)
Endotélio removido mecanicamente (E-)
Enzima conversora de angiotensina (ECA)
Erro padrão da média (EPM)
Espécies reativas de oxigênio (EROs)
Fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF)
Fenilefrina (Phe)
Graus célsius ($^{\circ}C$)
Grupo Controle (Ct)
Hiperpolarização derivada do endotélio (HDE)
Intramuscular (i.m)
Micrograma (μg)
Microlitro (μL)
Milimolar (mM)
Molar (M)
Músculo liso vascular (MLV)
Nanomolar (nM)
NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME)
Óxido nítrico (NO)
Óxido nítrico sintase (NOS)
Óxido nítrico sintase endotelial (eNOS)
Prostaciclina (PGI₂)
Prostaglandina E2 (PGE₂)

Radical hidroxila (OH•)

Receptor de tromboxano A2 (TP)

Sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA)

Tromboxano A2 (TXA2)

RESUMO

A testosterona é um hormônio vasoativo, que age por mecanismos genômicos e não genômicos. Agudamente, pode apresentar ações vasodilatadoras dependente do endotélio. Entretanto, ainda não está clara, a modulação, em longo prazo, da testosterona, sobre a regulação do tônus vascular. A hipótese desse estudo é de que, a testosterona participa, em longo prazo, da regulação da reatividade vascular, por uma via dependente do sistema renina angiotensina aldosterona.

Ratos machos Wistar (N=128), com 12 semanas de idade foram divididos em Controle (SHAM) e cirurgia de orquidectomia (OQT), tratados durante 3 meses com losartan, bloqueador de receptor para angiotensina II (SHAM+LOS e OQT+LOS, 15 mg/kg, s.c); espironolactona (SHAM+SPI e OQT+SPI, 80 mg/kg, gavagem), antagonista de receptor para mineralocorticoide e Apocinina, antioxidante inibidor da NADPH oxidase (SHAM+APO e OQT+APO, 30 mg/kg, água de beber), A reatividade vascular foi avaliada em anéis isolados de aorta torácica, como o percentual de resposta ao KCl (75 mM), nutridos com solução de Krebs modificado, pH 7,4, 36,5°C. A reatividade vascular foi avaliada *in vitro* como curvas concentração-resposta à fenilefrina (10^{-11} a 10^{-3} M) na presença e ausência de: L-NAME, 100 μ M; indometacina (INDO, 10 μ M), e anéis sem endotélio (E-). A peroxidação lipídica plasmática foi mensurada usando a técnica de TBARS. (CEUA-UFES 017/2020). Os resultados foram expressos como média \pm EPM e comparados usando teste t de *student*, análise de variância (ANOVA), uma via. Os grupos OQT, não tratados e os tratados com APO e LOS, apresentaram menor ganho de peso corporal ao final dos 3 meses (SHAM 231 \pm 11g; OQT= 158,4 \pm 13,0g*; OQT+APO 208,3 \pm 15,4g; OQT+LOS 156,0 \pm 23,0g * p <0,05). A R_{max} a fenilefrina foi igual entre os grupos SHAM e OQT. Os tratamentos durante 3 meses com LOS e APO não modificaram R_{max} a fenilefrina. Entretanto, o tratamento com LOS reduziu a pD_2 do grupo OQT (log EC50: OQT= -6,240 \pm 0,15 vs OQT+LOS= -7,218 \pm 0,23 * p <0.01). A inibição dos receptores de MR, com espironolactona, determinou uma menor contração máxima à fenilefrina no grupo OQT do que no SHAM, sugerindo então que esta via poderia ser dependente da testosterona. (SHAM+SPI =120,4 \pm 7,56 % n=10 vs OQT+SPI= 93,3 \pm 10,2 % n=10; * p <0,05). A reatividade à fenilefrina aumentou, na presença de L-NAME, e na ausência de E, de maneira semelhante entre os grupos. A inibição da via da COX, com indometacina, determinou redução da R_{max} em ambos os grupos (R_{max} SHAM= 118,3 \pm 8,04 vs SHAM+INDO = 56,27 \pm 6,61, p <0,01 e OQT= 119,8 \pm 8,41 vs OQT+INDO= 72,64 \pm

9,34, $p < 0,01$). Não houve diferença de reatividade entre os grupos incubados com indometacina (SHAM+INDO e OQT+INDO). Houve redução de RMax, na presença de indometacina, apenas no grupo OQT+SPI. Este resultado sugere a participação da aldosterona na via de ativação da COX, possivelmente de um vasoconstrictor, já que no grupo SHAM+SPI, a indometacina reduziu a contração máxima (Rmax: SHAM+SPI = $120,4 \pm 7,56$; OQT+SPI = $93,28 \pm 10,18$; SHAM+SPI+INDO = $89,99 \pm 8,45$; OQT+SPI+INDO = $74,15 \pm 7,92$, * $p < 0,05$). A produção de NO endotelial parece ter sido modificada no grupo tratado com losartan, sobretudo no grupo OQT+LOS-LN, sugerindo a importância da via da testosterona na produção de NO mediada pelos receptores de angiotensina II. Estes dados sugerem que a testosterona participa da produção de NO mediada pela angio II, pois quando retiramos a produção de NO, através do LN, no grupo castrado há uma redução da Rmáx em relação ao seu controle, sugerindo a importância da testosterona na resposta contrátil mediada pelo receptor de angiotensina AT1 (Rmáx: SHAM+LOS = $127,5 \pm 5,63$; OQT+LOS = $135,6 \pm 4,74$; SHAM+LOS LN = $183,4 \pm 10,50$; OQT+LOS LN = $151,8 \pm 8,311$; * $p < 0,05$). Os efeitos do tratamento com inibidor da angiotensina II, losartan, em anéis sem endotélio, mostraram que a lesão do endotélio provocou o aumento da resposta à fenilefrina no grupo SHAM. Entretanto, não houve diferença entre os grupos OQT+LOS E- e OQT+LOS CT, sugerindo uma modulação positiva vasoconstrictora que depende da presença de angiotensina II. A castração modificou a resposta dependente do endotélio durante o tratamento com losartan (Rmáx: SHAM+LOS = $127,5 \pm 5,63$; OQT+LOS = $135,6 \pm 4,74$; SHAM+LOS E- = $217,3 \pm 26,77$; OQT+LOS E- = $145,3 \pm 7,90$. * $p < 0,05$). O conjunto desses resultados sugerem a participação da testosterona e aldosterona, na modulação de longo prazo, da contração vascular, induzida pela fenilefrina.

Palavras-chave: Testosterona; Angiotensina II; Reatividade Vascular; Aldosterona, Hormônios Sexuais Masculinos; Endotélio Vascular.

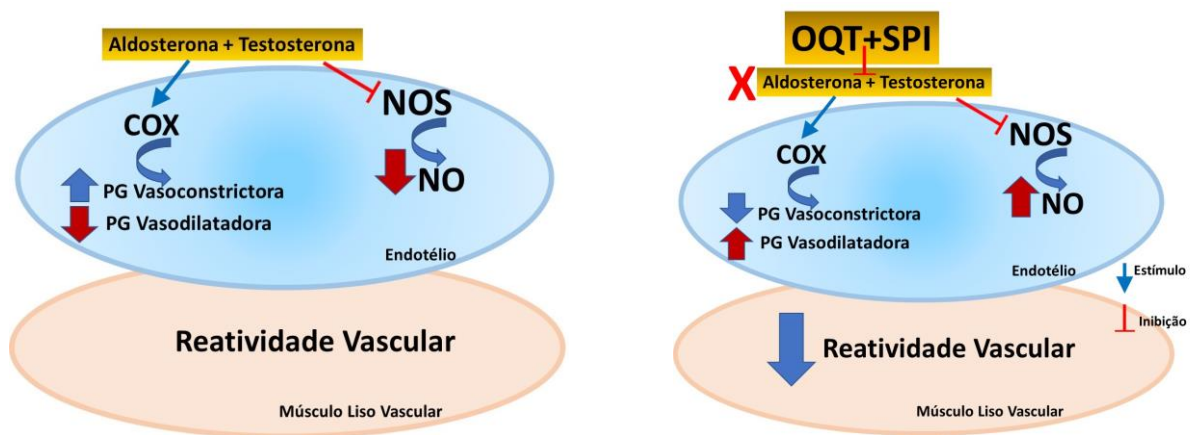
DESTAQUES

1. A resposta máxima a fenilefrina não foi diferente entre os grupos SHAM e OQT, com e sem endotélio e na presença de L-NAME;
2. Os tratamentos por 3 meses com losartan e apocinina, não modificaram a Rmax a fenilefrina intragrupo;

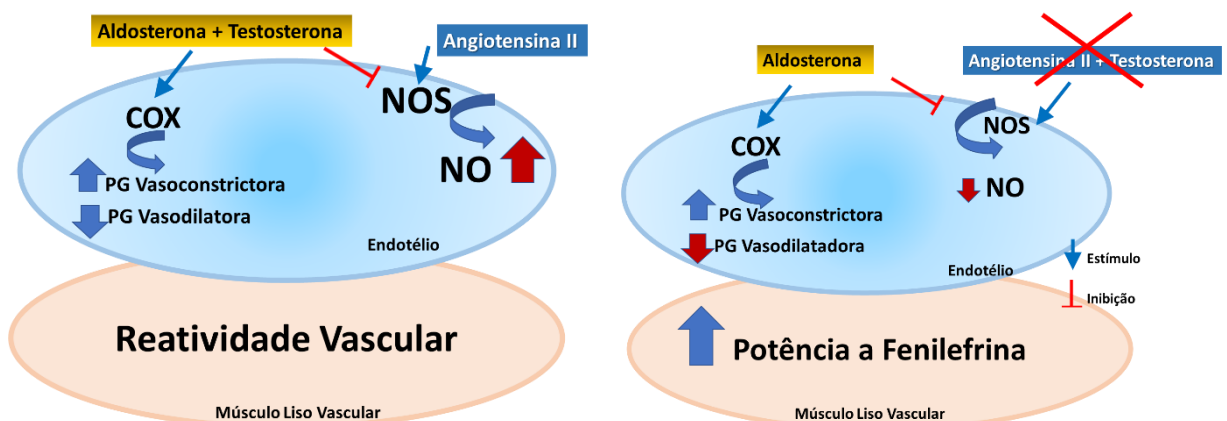
3. A reatividade a fenilefrina foi menor no grupo OQT+SPI quando comparado com aos grupos: OQT, SHAM+SPI;
4. Testosterona e Aldosterona, conjuntamente, regulam positivamente a reatividade vascular, possivelmente por diminuírem a biodisponibilidade de NO e estimular um prostanoide vasoconstrictor;

GRAPHIC ABSTRACT

1- O tratamento com espironolactona diminuiu a reatividade a fenilefrina no grupo orquidectomizado



2- O tratamento com Losartan aumentou a potência a fenilefrina no grupo orquidectomizado.



Hipótese do mecanismo envolvido no aumento da potência à fenilefrina, no grupo orquidectomizado tratado com losartan por 12 semanas. Na ausência de testosterona e bloqueio dos receptores para Angiotensina II, aldosterona provocaria inativação da

NOS, com redução de NO, e ativação da COX, com aumento de prostanoídes vasoconstritores ou redução de prostanoídes vasodilatadores.

ABSTRACT

Testosterone is a vasoactive hormone, which acts by genomic and non-genomic mechanisms. Acutely, it may have endothelium-dependent vasodilatory actions. However, the long-term modulation of testosterone on the regulation of vascular tone remains unclear. The hypothesis of this study is that, in the long term, testosterone participates in the vascular reactivity regulation, dependent on the renin-angiotensin-aldosterone system.

Wistar rats (N=128), at 12 weeks of age, were divided into male Control (SHAM) and orchietomy surgery (OQT), treated for 3 months with losartan, an angiotensin II receptor blocker (SHAM+LOS and OQT+ LOS), 15 mg/kg, s.c); spironolactone (SHAM+SPI and OQT+SPI, 80 mg/kg, gavage), mineralocorticoid receptor antagonist and apocynin, NADPH oxidase inhibitor (SHAM+APO and OQT+APO, 30 mg/kg, drinking water), Vascular reactivity was analysed in isolated aortic rings, as the percentage of response to KCl (75 mM), superfused with modified Krebs pH 7.4, 36.5°C. The presence of vascular presence was observed in vitro as curves-response to phenylephrine (10⁻¹¹ to 10⁻³ M) and absence of: L-NAME, 100 µM; indomethacin (INDO, 10 µM) and endothelium-denuded rings (E-). Plasma lipid peroxidation was measured using the TBARS technique. (CEUA-UFES 017/2020). Results were expressed as mean ± SEM and using Student's t test, analysis of variance (ANOVA), one way. The OQT groups, untreated and OQT treated with APO and LOS, had lower body weight at the end of the 3 months (SHAM 231 ± 11g; OQT= 158,4 ± 13,0g*; OQT+APO 208,3 ± 15,4g; OQT+LOS 156,0 ± 23,0g *p<0,05). The R_{max} for phenylephrine was the same between the SHAM and OQT groups. Treatments for 3 months with LOS and APO did not change R_{max} to phenylephrine. However, LOS treatment reduced the pD₂ of the OQT group (log EC₅₀: OQT= -6.240 ± 0.15 vs OQT+LOS= -7.218 ± 0.23 *p<0.01). Inhibition of MR receptors with spironolactone determined a lower maximal contraction to phenylephrine in the OQT group than in the SHAM, suggesting that this pathway could be testosterone dependent. (SHAM+SPI =120.4 ± 7.56% n=10 vs OQT+SPI= 93.3 ± 10.2% n=10; *p<0.05). Phenylephrine reactivity increased in the presence of L-NAME and in the absence of E, similarly between the groups. Inhibition of the COX pathway with indomethacin determined a

reduction in Rmax in both groups (Rmax SHAM= 118.3 ± 8.04 vs SHAM+INDO = 56.27 ± 6.61 , $p < 0.01$ and OQT= 119.8 ± 8.41 vs OQT+INDO= 72.64 ± 9.34 , $p < 0.01$). There was no difference in reactivity between the groups incubated with indomethacin (SHAM+INDO and OQT+INDO). There was a reduction in RMax, in the presence of indomethacin, only in the OQT+SPI group. This result suggests the participation of aldosterone in the COX activation pathway, possibly of a vasoconstrictor, since in the SHAM+SPI group, indomethacin reduced the maximum contraction (Rmax: SHAM+SPI = 120.4 ± 7.56 ; OQT+ SPI= 93.28 ± 10.18 ; SHAM+SPI+INDO = 89.99 ± 8.45 ; OQT+SPI+INDO = 74.15 ± 7.92 , * $p < 0.05$). Endothelial NO bioavailability seems to have been modified in the group treated with losartan, especially in the OQT+LOS-LN group, suggesting the importance of the testosterone pathway in the production of NO mediated by angiotensin II receptors. These data suggest that testosterone participates in the production of NO mediated by angio II, because when we remove the production of NO, through the LN, in the OQT group, there was a reduction in Rmax in relation to its control. It suggests the importance of testosterone in the contractile response. mediated by the AT1 angiotensin receptor (Rmax: SHAM+LOS = 127.5 ± 5.63 ; OQT+LOS = 135.6 ± 4.74 ; SHAM+LOS LN = 183.4 ± 10.50 ; OQT+LOS LN = 151.8 ± 8.311 ; * $p < 0.05$). The effects of treatment with the angiotensin II inhibitor, losartan, on rings without endothelium, showed that the endothelium injury caused an increase in the response to phenylephrine in the SHAM group. However, there was no difference between the OQT+LOS E- and OQT+LOS CT groups, suggesting a vasoconstrictor positive modulation that depends on the presence of angiotensin II. These data suggest that testosterone participates in the production of NO mediated by angio II, because when we remove the production of NO, through the LN, in the castrated group there is a reduction in Rmax in relation to its control, suggesting the importance of testosterone in the contractile response. mediated by the AT1 angiotensin receptor (Rmax: SHAM+LOS = 127.5 ± 5.63 ; OQT+LOS = 135.6 ± 4.74 ; SHAM+LOS LN = 183.4 ± 10.50 ; OQT+LOS LN = 151.8 ± 8.311 ; * $p < 0.05$). The effects of treatment with the angiotensin II inhibitor, losartan, on rings without endothelium, showed that the endothelium injury caused an increase in the response to phenylephrine in the SHAM group. However, there was no difference between the OQT+LOS E- and OQT+LOS CT groups, suggesting a vasoconstrictor positive modulation that depends on the presence of angiotensin II. Orchiectomy modified the endothelium-dependent response during treatment with losartan (Rmax: SHAM+LOS

= 127.5 ± 5.63 ; OQT+LOS = 135.6 ± 4.74 ; SHAM+LOS E- = $217.3 \pm 217.3 \pm 26.77$; OQT+LOS E- = 145.3 ± 7.90 . * $p < 0.05$). In conclusion, the set of these results suggest the long term participation of testosterone and aldosterone in the modulation of vascular contraction induced by phenylephrine.

1 INTRODUÇÃO

A terapia de privação androgênica (ADT) é o tratamento padrão para câncer de próstata metastático, especialmente para pacientes com doença metastática (KAKARLA et al., 2022; MILLER, 2016). A incidência de infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, diabetes e até mortalidade aumenta em pacientes que recebem ADT. De acordo com Saigal et al. (2007) (SAIGAL et al., 2007), pacientes com câncer de próstata em uso de ADT por pelo menos um ano apresentaram risco 20% maior de morbidade cardiovascular. Os indivíduos começaram a encontrar esse risco elevado após apenas 12 meses de tratamento. Teoh et al. (2020) (TEOH et al., 2022) afirmam que a castração cirúrgica está ligada a um maior risco de eventos trombóticos cardiovasculares. No entanto, os mecanismos fisiopatológicos de como a ADT aumenta o risco cardiovascular e induz eventos cardiovasculares ainda não estão claros. Foi demonstrado que a ADT causa disfunção endotelial em ratos machos. Tal mudança pode estar associada à regulação positiva e ativação do estresse oxidativo induzido por Angiotensina II e pela enzima NOX vascular (TEOH et al., 2015). A testosterona, o principal andrógeno, é um hormônio vasoativo, que atua por mecanismos genômicos e não genômicos. Agudamente, a testosterona pode apresentar ações vasodilatadoras dependente do endotélio. Entretanto, ainda não está clara, sua modulação, em longo prazo sobre a regulação do tônus vascular (CONVERSE; THOMAS, 2021; KOUKOULIS et al., 2022).

1.1 Testosterona

1.1.1 Histórico

Foi em meados de 1889 que as primeiras experiências do Fisiologista francês Charles Edward Brown-Séguard, com testosterona, foram comunicadas. Aos 72 anos de idade, ele apresentou as primeiras provas indiretas da ação androgênica através de secreção interna depois de injetar em si mesmo um extrato testicular e perceber a melhoria da sua saúde consideravelmente. Quase cinco décadas depois (1935), Ernst Laqueur cristalizou, em seu laboratório, a substância ativa a partir de um extrato obtido de testículos de touro e este parecia preencher todos os critérios para um hormônio androgênico completo. Após caracterizá-lo quimicamente e fisiologicamente ele e seus colaboradores batizaram o hormônio de testosterona (BRINKMANN, 2011).

Apesar de todo conhecimento acumulado no último século sobre a testosterona e sua importância para vários órgãos e funções do corpo, a discussão a respeito do papel da testosterona para os seres vivos, sobretudo no contexto das doenças cardiovasculares, ainda é extremamente relevante e necessária.

1.1.2 Mecanismos de síntese, armazenamento e transporte da testosterona

Apesar de ser conhecida como hormônio sexual masculino, o principal dos andrógenos endógenos, a testosterona não é exclusividade masculina; mulheres podem produzi-la nos ovários e glândulas adrenais além de, durante a gravidez, o conjunto feto-placenta sintetizar andrógenos e estrógenos que desempenham um importante papel biológico nos estágios de desenvolvimento do feto (LORIGO et al., 2019). O GnRH, hormônio liberador de gonadotrofina é o hormônio responsável por regular de forma indireta a atividade gonadal; este age na pituitária anterior para estimular a liberação do hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH). Nos testículos de homens, o LH estimula a síntese de testosterona pelas células de Leydig e o FSH estimula a espermatogênese pelas células de Sertoli.

Na fase fetal, a testosterona é secretada pelas células de Leydig fetais, estimulada pela gonadotrofina coriônica humana (hCG), e agindo localmente induzindo a diferenciação dos dutos de Wolff em epidídimo, ducto deferente e vesículas seminais entre a 9ª e 13ª semanas de gestação; a regressão dos dutos de Müller é induzida pela ação local do hormônio anti-Mülleriano (AMH), secretado pelas células de Sertoli. A diferenciação da genitália externa em pênis, bolsa escrotal e uretra peniana também ocorre entre a 9ª e 13ª semanas de gestação e requer adequada concentração de testosterona e conversão desta para um outro andrógeno mais potente, a dihidrotestosterona (DHT), através da ação da 5 α -redutase em tecidos-alvo (MENDONÇA et al., 2005).

A testosterona circula na corrente sanguínea principalmente ligada à proteínas séricas, como a albumina e a SHBG (do inglês *sexual hormone-binding globulin*), globulina ligadora de hormônio sexual, um homodímero de duas subunidades de glicoproteína, cada uma delas compreendendo 373 aminoácidos e contendo um único sítio de ligação de esteróides de alta afinidade (HANDELSMAN, 2020).

Apenas 2-3% da testosterona circulante é livre e o nível máximo é atingido em torno dos 30 anos em homens e cai 1-2% por ano a partir de então. Biologicamente ativa, a testosterona livre se liga aos receptores de andrógenos (AR, do inglês *Androgen Receptor*) presentes no citosol e na membrana (LORIGO et al., 2019; ROBERT A. KLONER, CULLEY CARSON III, ADRIAN DOBS, STEPHEN KOPECKY, 2016).

A molécula de testosterona é sintetizada a partir de uma sequência enzimática de passos a partir da molécula de colesterol. O colesterol tem origem predominantemente na via de síntese de acetil-CoA com a hormônio luteinizante que regula a etapa que limita a taxa de conversão do colesterol em pregnenolona dentro das mitocôndrias, enquanto as etapas enzimáticas restantes ocorrem no retículo endoplasmático liso. A testosterona e o seu metabolito androgênico, a di-hidrotestosterona (DHT), exercem efeitos biológicos diretos através da ligação ao AR e ação indireta através da aromatização da testosterona ao estradiol, o que permite uma ação através da ligação ao receptor de estrogênio (ER, do inglês *strogen receptor*) (Figura 1) (HANDELSMAN, 2020). Portanto há um precursor comum para estrogênios e andrógenos, com caráter lipofílico e por este motivo há uma facilidade em atravessar membranas biológicas.

A testosterona circula no sangue em concentrações maiores que sua solubilidade aquosa ligando-se à proteínas plasmáticas em circulação e a mais importante destas é a SHBG e conseqüentemente, a concentração de SHBG influencia fortemente a atividade e os efeitos da testosterona (HANDELSMAN, 2020).

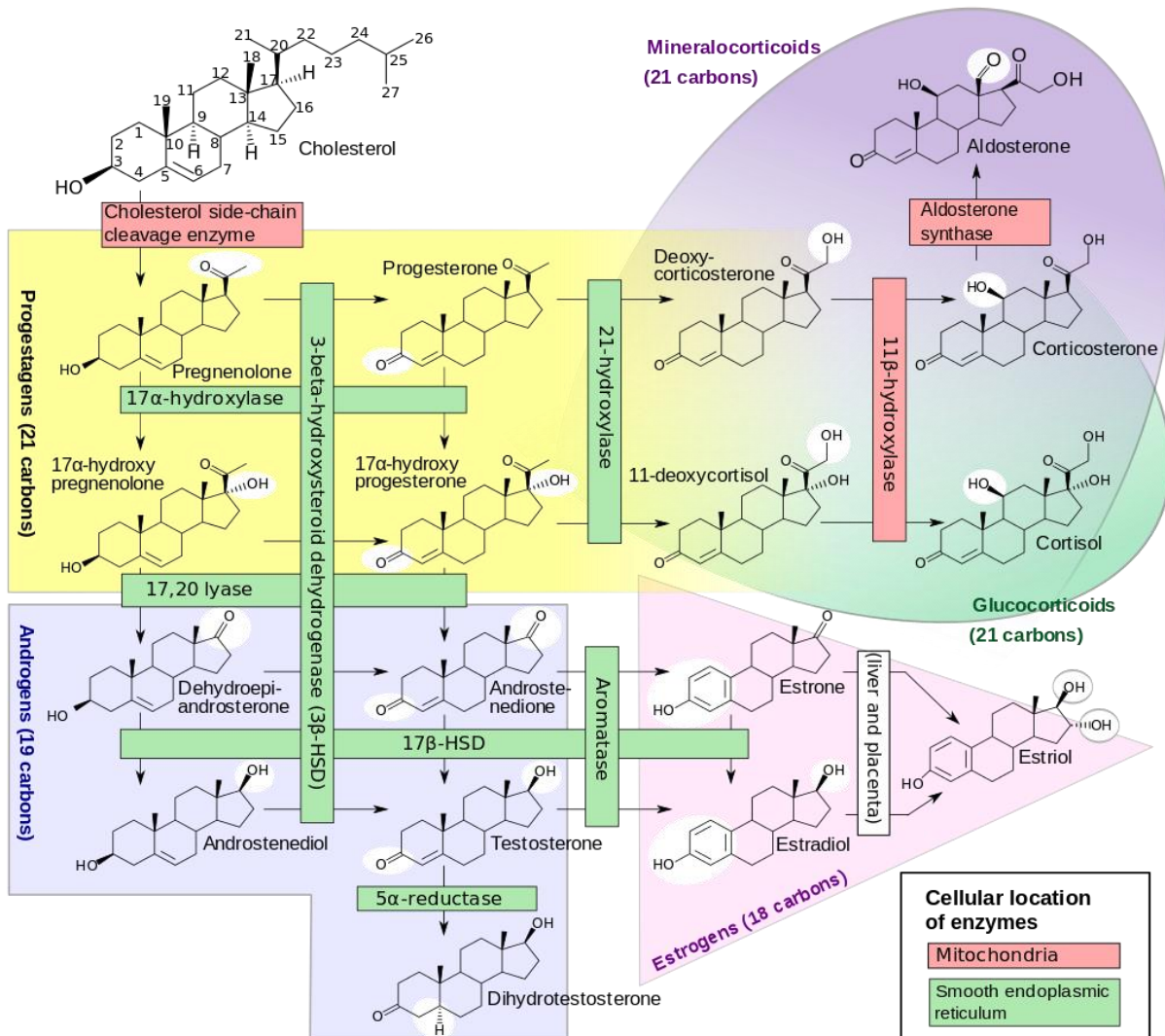


Figura 1 – Diagrama das vias da esteroidogênese humana (HÄGGSTRÖM; RICHFIELD, 2014)
 Fonte: Häggström M, Richfield D (2014). "Diagram of the pathways of human steroidogenesis".
 Wikiversity Journal of Medicine 1 (1). DOI:10.15347/wjm/2014.005. ISSN 20018762.

1.1.3 Interação da testosterona com o sistema cardiovascular

Hormônios esteroides tem papéis na regulação de uma ampla variedade de processos corporais incluindo regulação de pressão sanguínea (LYRIO; RIBEIRO JR; STEFANON, 2014), indicando a importância destes para o sistema cardiovascular.

A concentração de testosterona decresce com a idade; esta diminuição tem sido associada com um aumento na aterosclerose e risco cardiovascular. Em condições clínicas, como diabetes mellitus tipo 2, hipotireoidismo, obesidade, síndrome nefrótica pode ocorrer a diminuição da concentração plasmática de SHBG, o que, segundo o *European Male Aging Study - EMAS*, pode resultar em mais testosterona livre. A senilidade, hipertireoidismo e a cirrose aumentam as concentrações plasmáticas de

SHBG e podem resultar em uma concentração aumentada de testosterona livre na faixa hipogonadal (ROBERT A. KLONER, CULLEY CARSON III, ADRIAN DOBS, STEPHEN KOPECKY, 2016; WU et al., 2008).

Em mulheres, o estrogênio exerce uma função protetiva para o sistema cardiovascular. Entretanto, no período pós menopausa, a deficiência nos níveis de estrogênio pode contribuir para o aparecimento de doenças cardiovasculares. Nos homens, ainda não temos um consenso sobre o impacto dos hormônios sexuais masculinos sobre o sistema cardiovascular. Há indícios de que a mesma proteção verificada em fêmeas parece acontecer com os androgênios, mas como os mecanismos ainda não estão elucidados.

Estudo publicado por nosso grupo mostrou que a orquidectomia previne a disfunção da contratilidade induzida pelo infarto do miocárdio em ratos machos (RIBEIRO JR et al., 2017). Uma explicação para este fato poderia ser o aumento do transiente de cálcio e da expressão da proteína SERCA-2. Neste estudo, a reposição de testosterona restaurou o comprometimento da contratilidade no grupo castrado e infartado, apoiando a idéia de que a testosterona tem efeitos negativos sobre a contratilidade cardíaca. Os autores sugeriram que, a deficiência de testosterona, poderia ter benefícios após um evento de infarto do miocárdio (RIBEIRO JR et al., 2017).

Segundo (LYRIO; RIBEIRO JR; STEFANON, 2014), consideráveis evidências sugerem que a testosterona, e outros andrógenos, têm efeito protetor no SCV e podem desempenhar um papel importante na regulação aguda da função vascular. Muito embora os estudos continuam deixando pontos de divergência em relação aos benefícios da terapia de reposição hormonal. Alguns apontam que a baixa concentração de testosterona contribui para um prejuízo/aparecimento de DCV. No entanto, estudos demonstraram que a terapia para repor testosterona exógenamente de forma que sua concentração se regularize, promove aumento de eventos adversos na população estudada (LYRIO; RIBEIRO JR; STEFANON, 2014).

1.1.4 Interação da testosterona e do sistema vascular

A testosterona é capaz de agir nos vasos modulando a tensão do MLV diretamente ou através do endotélio vascular.

1.1.4.1 Estrutura dos vasos sanguíneos

Estruturalmente os vasos sanguíneos são compostos por três camadas, também chamadas de túnicas: adventícia, média e íntima, esta última composta por lâmina elástica interna, lâmina basal e endotélio; cada uma exercendo sua função no intuito principal de circulação do sangue entre os tecidos (Figura 2). Estas camadas podem ser influenciadas por fatores mecânicos, como a pressão sanguínea, ou metabólicos com influência local no tecido do vaso. Os capilares não compartilham de todas estas camadas, estando compostos apenas por endotélio e sua membrana basal.

A **túnica adventícia** se compõe principalmente de colágeno tipo I e fibras elásticas. A **túnica média** é onde estão as células musculares lisas dispostas concentricamente e organizadas helicoidalmente e entremeadas de matriz extracelular (fibras e lamelas elásticas e colágeno tipo III representado pelas fibras reticulares; proteoglicanos e glicoproteínas.), cujas moléculas são produzidas pelas próprias células do músculo liso. A **túnica íntima** é composta pelas células endoteliais apoiada na camada subendotelial (camada de tecido conjuntivo frouxo), e nas artérias a íntima está separada da média por uma lâmina elástica interna composta majoritariamente de elastina; esta lâmina é fenestrada para proporcionar difusão de substâncias (JUNQUEIRA; CARNEIRO; ABRAHAMSOHN, 2018).

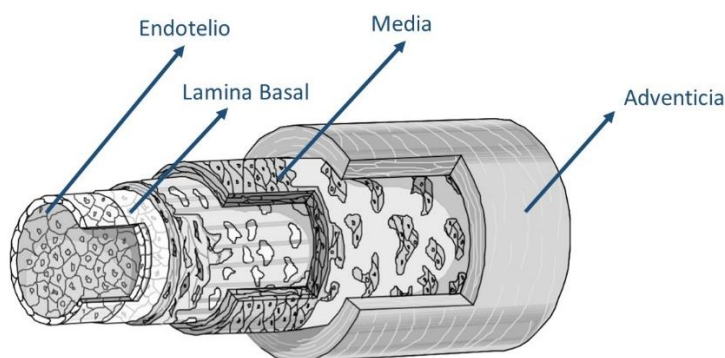


Figura 2 – Diagrama estrutural de artéria muscular de médio calibre. Fonte: criado em LifeART Collection Images.

1.1.4.2 Músculo liso vascular (MLV)

Tecido altamente especializado com função majoritária de contração e regulação do tônus vascular, da pressão sanguínea e do fluxo sanguíneo. As células do músculo liso vascular (MLV), maduras, apresentam baixa taxa de proliferação, baixa atividade sintética e expressam um arsenal peculiar de proteínas contráteis, canais iônicos e moléculas de sinalização necessárias para a contratilidade da célula que é muito peculiar destas células, portanto não sendo encontradas em outras. Durante a angiogênese a principal função destas células é a proliferação e produção de componentes da matriz da parede do vaso; além disso, quando maduras, o MLV têm alta capacidade de plasticidade, o que permite mudanças profundas e reversíveis no fenótipo em resposta à sinalização ambiental local (OWENS, 1995; RZUCIDLO; MARTIN; POWELL, 2007).

Desde a década de 1950, os pesquisadores vêm desvendando e comprovando a importância do íon cálcio (Ca^{2+}) para a contração celular, através de técnicas experimentais para investigar mecanismos celulares envolvidos na contração e relaxamento dos três tipos de músculos, inclusive o liso.

MLV modula o diâmetro do vaso, e conseqüentemente, a resistência vascular. A resposta contrátil do MLV depende da concentração citoplasmática de Ca^{2+} , o qual se liga a calmodulina possibilitando a ativação de uma quinase que fosforila a cadeia leve de miosina (MLCK – *myosin light chain kinase*) o que ativa o processo contrátil. Em geral as isoformas da MLCK, como a isoforma do MLV, são dependentes de uma proteína de ligação ao cálcio como mediadora intermediária, a calmodulina. A atividade da MLCK aumenta cerca de 1000 vezes em resposta ao aumento da concentração de Ca^{2+} citosólico e isso desencadeia a contração no MLV (RESENDE; GUATIMOSIN; LEITE, 2012; TOUYZ et al., 2018).

O aumento da concentração citoplasmática de Ca^{2+} é maior pela ativação por agonistas, do que pela despolarização induzida. O potencial de ação do músculo liso, na maioria dos casos, é gerado por canais de Ca^{2+} tipo L, mais do que os de sódio (Na^+) regulado por voltagem, e isto é uma importante via de acesso de cálcio para o citosol. O Ca^{2+} é essencial para a contração de uma forma geral, o qual pode ser armazenado no retículo sarcoplasmático (RS). Sua liberação depende da ativação do trifosfato de inositol, IP_3 , que pode ser gerado pelo estímulo de agonistas como os receptores para angiotensina II, como o AT1, peptídeos vasoativos, como a ET-1

(receptor de endotelina 1), e pelos α_1 -adrenérgicos (estímulo neuro-humoral); estes por sua vez ativarão receptores acoplados à proteína G_q . A enzima fosfolipase C, que ao atuar sobre o PIP_2 (fosfatidil inositol 4,5-bifosfato) presente na membrana plasmática originará dois importantes segundos mensageiros, o IP_3 e DAG (diacilglicerol) (TOUYZ et al., 2018). O DAG ativa a proteína cinase, como por exemplo a proteína cinase C (PKC), que migra do citosol para a membrana onde fosforila canais de Ca^{2+} e promoverá seu influxo de Ca^{2+} para o citosol. Esta ação, causa o aumento da concentração do Ca^{2+} citoplasmático que ficará disponível para a contração. O IP_3 por sua vez se liga ao receptor de IP_3 (IP_3R) que libera Ca^{2+} do retículo causando um influxo deste para o citosol; com sua concentração citoplasmática de Ca^{2+} aumentada, haverá mais interação deste com a calmodulina, Ca^{2+} -Calmodulina, que é determinante para a função da MLCK, que levará à fosforilação da miosina e por fim à contração muscular (Figura 3). (RESENDE; GUATIMOSIN; LEITE, 2012).

Há mecanismos de contração independentes do Ca^{2+} associados com alteração da sensibilização de Ca^{2+} e remodelamento do filamento de actina e aumento da biodisponibilidade de espécies reativas de oxigênio (*ROS – reactive oxygen species*), da qual falaremos adiante, e estes também modulam a contração vascular (TOUYZ et al., 2018).

O relaxamento do MLV, pode ser gerado pela ativação de receptores β -adrenérgicos acoplados à proteína G_s . Esta proteína estimulará a produção de AMP_c e ativação da PKA (proteína cinase dependente de AMP_c). A PKA levará à redução da concentração de Ca^{2+} no citosol, portanto contribuindo com a cessação da contração (LINCOLN; SELLA, 2001; RESENDE; GUATIMOSIN; LEITE, 2012).

Os receptores muscarínicos M_3 , também da família de receptores acoplados à proteína G, no MLV quando estimulados resultam na liberação de NO (*nitric oxide – óxido nítrico*) pelas células endoteliais provocam relaxamento nesta musculatura. O endotélio também secreta vasoconstritores que regulam a contração vascular, por exemplo endotelina-1 (ET-1) e prostanóides vasoconstritores (TOUYZ et al., 2018) (vide Figura 4).

O mecanismo-chave vasodilatador da testosterona tem sido proposto por vários estudos e envolve a abertura do canal de potássio e/ou inativação do canal de cálcio (figura 3) e geralmente por ações não genômicas.

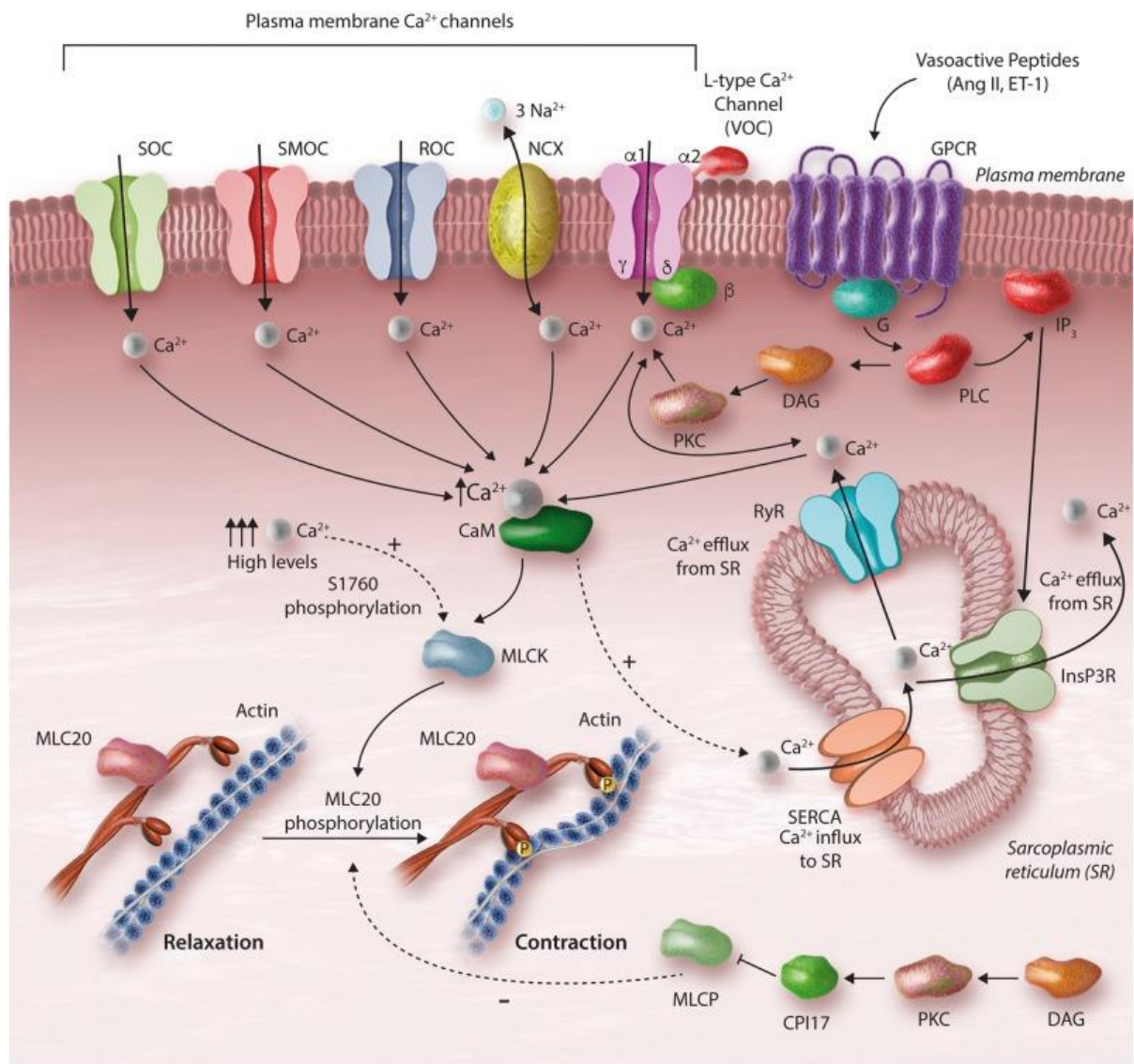


Figura 3– Regulação dependente de Ca²⁺ da contração do MLV. Vasoconstritores induzem a contração do MLV pelo aumento da concentração intracelular de Ca²⁺. Peptídeos vasoativos, assim como Angiotensina II, liga-se ao receptor acoplado à proteína G (GPCRs, do inglês *G protein-coupled receptors*) ativam a fosfolipase C (PLC) levando à (i) produção de IP₃ e (ii) formação de diacilglicerol (DAG). IP₃ liga-se ao receptor IP no canal de Ca²⁺ (InsP₃R) e induz a liberação de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático (SR, do inglês *sarcoplasmic reticulum*). DAG causa a ativação da proteína cinase C (PKC), que influencia os canais de Ca²⁺, assim como os SOC (do inglês, *store-operated Ca²⁺ channel*) ou canal de cálcio operados por estoque; SMOC (do inglês, *second messenger-operated Ca²⁺ channel*) ou canal de cálcio operado por segundos mensageiros; canal de cálcio operado por voltagem (VOC, do inglês *voltage-gated Ca²⁺ channel*) e o trocador Na⁺-Ca²⁺ (NCX, do inglês, *Na⁺-Ca²⁺ exchanger*). A PKC também estimula a atividade do receptor de rianodina do canal de cálcio (RyR) induzindo a liberação do Ca²⁺ do SR. A atividade da MLCP (Fosfatase das cadeias leves de miosina) pode ser reduzida pela fosforilação da CPI-17. Ca²⁺ se liga à calmodulina e ativa a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK do inglês, *myosin light chain kinase*), levando à fosforilação da Ser19, polimerização da actina, e contração vascular (TOUYZ et al., 2018).

1.1.4.3 Endotélio vascular

O endotélio vascular, do ponto de vista histológico é composto por células epiteliais, denominado epitélio simples, células achatadas de núcleos alongados que revestem o interior dos vasos sanguíneos. O endotélio vascular forma uma barreira semipermeável interposta entre dois compartimentos do meio interno: o plasma sanguíneo e o fluido intersticial, além de secretar moléculas biologicamente ativas (JUNQUEIRA; CARNEIRO; ABRAHAMSOHN, 2018).

Os estudos sobre o endotélio vascular, feitos no final da década de 70 e início da década de 80 têm relevância sustentada até os dias de hoje. Colocamo-nos sobre ombros de gigantes como, Paul M. Vanhoutte, Salvador Moncada, Robert F. Furchgott, Anne Higgs, Louis J. Ignarro, entre tantos outros, quando ainda hoje exploramos o universo que constitui o endotélio e suas interações biológicas no sistema vascular.

Quem primeiro indicou que o endotélio possuía importância no controle do tônus vascular, através de produção de substâncias vasoativas, depois demonstraram que as células do endotélio tinham papel no relaxamento vascular em resposta à acetilcolina (ACh) foram Furchgott e Zawadzki, 1980. Mais tarde ficou claro a existência de um fator que causava relaxamento vascular e que este estava ligado ao endotélio, inicialmente assim chamado, fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), e posteriormente identificado como óxido nítrico (NO) (ROBBINS; GRISHAM, 1997).

O endotélio responde à estímulos humorais, neurais e especialmente hemodinâmicos; além de regular a função plaquetária, respostas inflamatórias, crescimento e migração do músculo liso vascular e modular o tônus vascular sintetizando e liberando substâncias vasoativas. Este age também como uma barreira seletiva dividindo o interior e o exterior dos compartimentos vasculares fornecendo revestimento não trombogênico ao sistema cardiovascular. A função de barreira está entre as mais básicas do endotélio vascular, regulando o transporte de macromoléculas entre o lúmen vascular e o músculo liso. Há mecanismos variados pelos quais as macromoléculas atravessam a barreira endotelial: através das próprias células endoteliais, difundindo-se lateralmente dentro da membrana da célula endotelial e assim ao redor da célula, também através das junções existentes entre as células, através das *gaps* endoteliais, ou através do transporte vesicular. A maioria das

moléculas são grandes demais, aniônicas ou hidrofílicas para atravessar a membrana da célula livremente, então são necessários mecanismos tais como as junções intercelulares, transporte vesicular ou a existência de canais transitórios resultantes da fusão de vesículas para o transporte das macromoléculas.

O endotélio está posicionado anatomicamente num local que permite a interação não apenas com os componentes circulantes do sangue e as células, como também com parede vascular, regulando o transporte de macromoléculas entre o lúmen do vaso e o músculo liso vascular (CAHILL; REDMOND, 2016).

Os pioneiros do estudo do endotélio inicialmente nominaram de fator (*endothelial-derived relaxing factor - EDRF*), um fator que causava o relaxamento vascular, sendo mais tarde identificado por Palmer e Ignarro em 1987. Curiosamente, o mesmo grupo, fez esta descoberta no mesmo ano, identificando o EDRF, como análogo ao óxido nítrico.

Entre os fatores relaxantes do endotélio estão também as prostaciclinas e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (*EDHF*).

- Fatores relaxantes derivados do endotélio

Óxido Nítrico

Este é um sinalizador celular diferente do habitual, chamado por Förstermann e Sessa de molécula sinalizadora pouco ortodoxa, por possuir numerosos alvos celulares. O NO controla funções que vão desde neurotransmissão, regulação do tônus vascular por estimulação da guanilato ciclase sensível ao NO, até transcrição gênica e transdução de RNA mensageiro produzindo modificações pós transdução de proteínas (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).

O NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina, por uma família de enzimas chamadas de óxido nítrico sintases ou NO sintases, ou simplesmente NOS; síntese feita pela maioria das células na parede do vaso (MONCADA, 1994; OLIVEIRA-FILHO, 2012; ROBBINS; GRISHAM, 1997; RUBANYI, 1991; SCHINI; VANHOUTTE, 1993).

Nos mamíferos, incluindo os humanos, o NO pode gerar três diferentes isoformas da NOS: neuronal, nNOS ou NOS I; induzível, iNOS ou NOS II, e endotelial, eNOS ou NOS III.

Todas as isoformas de NOS utilizam a L-arginina como substrato e o oxigênio molecular e nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) reduzidos, ou seja, com ganho de elétrons, como co-substratos; flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN), e (6R-) 5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterina (BH4) são co-fatores de todas as isoenzimas.

Todas as isoenzimas da NOS são homodímeros, ou seja, são formadas por dois componentes chamados dímeros idênticos, o monômero 1 e o monômero 2, possuindo domínios redutases e domínios oxidases em cada monômero. Para a formação do óxido nítrico, a NOS funcional transfere elétrons liberados do NADPH na região do domínio redutase, e via FAD e FMN para o heme na região do domínio oxigenase. O domínio oxigenase também liga o co-fator essencial BH4, o oxigênio molecular e o substrato L-arginina.

Em vasos sanguíneos, saudáveis a produção de NO se dá devido a forma constitutiva da NOS, dependente de cálcio presente nas células endoteliais, mas quando há uma injúria no sistema vascular há ativação dos mecanismos de defesa e mediadores inflamatórios e reações imunológicas e uma NOS não responsiva ao cálcio produz NO em grande quantidade nas células da parede do vaso, também conhecida por iNOS, ou NO sintase induzível. (MONCADA, 1994; OLIVEIRA-FILHO, 2012; ROBBINS; GRISHAM, 1997; RUBANYI, 1991; SCHINI; VANHOUTTE, 1993). Embora não seja alvo de nosso interesse neste momento, há ainda a isoforma NOS neuronal, presente no músculo esquelético, pulmões, testículos, próstata, pele e nos neurônios vasopressinérgicos do hipotálamo.

Como uma molécula gasosa, lipossolúvel com uma meia vida curta, o NO desenvolve amplo papel nas funções fisiológicas, que vão desde modulação da motricidade do vaso, proliferação celular e interação das células do sangue com a parede vascular, por este motivo a produção inadequada de NO contribui para uma série de doenças cardiovasculares como hipertensão, aterosclerose (SCHINI; VANHOUTTE, 1993). Diminuir a produção de NO pode levar à vasoconstrição, assim como uma superprodução poderia causar uma vasodilatação patológica.

Sendo o NO uma molécula lipofílica, este pode rapidamente se difundir através das membranas biológicas e isso promove comunicação entre as células endoteliais e células do ML, bem como neurônios terminais e a células do ML (KATUSIĆ, 1992).

Em suma, o NO atua em diversas sinalizações celulares relacionadas à enzimas e proteínas-alvo, e pesquisadores afirmam que a via de sinalização estimulada pelo NO mais importante é a ativação da guanilato ciclase solúvel e a geração de GMP cíclico (GMP_c).

Especificamente sobre a NOS endotelial (eNOS), sabemos que a CaM ativada por Ca²⁺ é um importante regulador da atividade da eNOS; esta produz NO de maneira importante, ficando claro que quando há o aumento da atividade da eNOS, o Ca²⁺ intracelular também está aumentado.

Segundo Förstermann e Sessa (2012), o Ca²⁺ induz a ligação da CaM à enzima, mas há outras proteínas que também tem efeito regulador na atividade da eNOS, como a hsp90 (*heat shock protein*), a caveolina-1, assim como estímulos físicos como *shear stress*, entre outros (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; HEMMENS; MAYER, 1998).

As funções fisiológicas da eNOS incluem principalmente a vasodilatação e inibição de agregação plaquetária e adesão pela estimulação da guanilato ciclase solúvel e aumento do GMP cíclico nas células do ML; inclui inibição da adesão de leucócitos e inflamação vascular pelo controle do NO endotelial na expressão de genes envolvidos na aterogênese; inclui controle da proliferação do MLV e estes efeitos antiproliferativos provavelmente são mediados pelo GMP cíclico (FÖRSTERMANN, 2008; FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).

O NO afeta, não somente o MLV, mas também plaquetas, inibindo a agregação plaquetária e sua adesão ao endotélio. O efeito de antiagregação do NO age de forma sinérgica com a prostaciclina, portanto a liberação combinada destes pode representar um mecanismo fisiológico com objetivo de prevenir a formação de trombos (RUBANYI, 1991).

Prostaciclina (PGI₂)

Caracterizada como um metabólito do ácido aracdônico, a prostaciclina que é catalisada enzimaticamente pela ciclooxigenase e prostaciclina sintase. É comumente conhecida como um vasodilatador, inibidor de agregação plaquetária e inibidor de

proliferação de células musculares lisas vasculares (VSMC) (LI et al., 2021; VANE; CORIN, 2003).

Os efeitos cardioprotetores da PGI₂ são mediados pelos receptores de prostaciclina, receptor IP, que estimula a adenilatociclase e isso gera o mensageiro secundário adenosina monofosfato cíclico (cAMP), ativando finalmente a sinalização da proteína quinase A (PKA). Ao ativar os receptores de prostaciclina (receptores IP), a prostaciclina (PGI₂) exerce efeitos protetores cardiovasculares, como vasodilatação e inibição da proliferação de células musculares lisas vasculares (VSMC);

Estudos de Li et al, 2021 mostraram que estes efeitos são abolidos por condições como hipertensão, dislipidemia e envelhecimento, e além de abolidos, pode ter efeitos opostos aos protetores; e sob estas condições, estudos em ratos espontaneamente hipertensos, mostraram que houve um aumento da liberação de prostanóides, cujo PGI₂ é a principal forma, ao invés de ativar receptores IP para causar relaxamento das células do músculo liso vascular a liberação do PGI₂ pelo endotélio inicia vasoconstrição; e ao inibir os receptores TP, receptores de tromboxano, estas contrações foram inibidas, assim, a produção de uma grande quantidade de PGI₂ derivado do endotélio sob condições hipertensivas resulta na ativação paradoxal dos receptores TP nos VSMCs, causando, assim, contrações dependentes do endotélio. No entanto, não se sabe se a deficiência do receptor IP inicia ou não a mudança do PGI₂ de exercer efeitos protetores para efeitos prejudiciais na remodelação vascular. (LI et al., 2021).

Fator Hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)

Enquanto o NO tem ação relaxante, como principal via de ação a guanilato ciclase solúvel, gerando o aumento do GMP, o EDHF parece ativar canais de K⁺ no MLV (RUBANYI, 1991) Dados sugerem que subtipos de receptores muscarínicos mediam a liberação de NO (receptor tipo M₂) e EDHF (receptor tipo M₁).

Estudos têm avaliado o NO e sua modulação através da testosterona, mais comumente sob a luz da deficiência da testosterona e a disfunção endotelial que pode levar à disfunção erétil e/ou disfunção vascular, ou até mesmo suas ações sobre o

sistema reprodutor (CHISTIAKOV et al., 2018; KELLY; JONES, 2013). Entretanto, não há muitos estudos sobre seu efeito vascular e sua relação com doenças vasculares. Tem sido descrito que, em concentrações fisiológicas de testosterona induz o relaxamento de muitos leitos vasculares por meio de fatores relaxantes derivados do endotélio incluindo o NO e prostaciclina (Figura 5) (ALVES et al., 2020; CHISTIAKOV et al., 2018; YU et al., 2010).

Nas células endoteliais, a eNOS (NO sintase endotelial) é uma enzima chave para a produção de NO, após a conversão do substrato L-arginina em L-citrulina, e a fosforilação do eNOS na serina-1177 que é conhecida por aumentar a atividade enzimática. Yu et al., 2010, afirmam que o aumento da produção de NO pela testosterona, foi abolido pelo pré-tratamento das células com um inibidor de NOS, L-NAME, indicando o envolvimento de eNOS na estimulação da testosterona (YU et al., 2010).

O sistema renina angiotensina aldosterona é um sistema hormonal que envolve a regulação da pressão do sangue e o equilíbrio da água, mas também pode contribuir para o desenvolvimento de doença cardiovascular (LU et al., 2019). Os elementos envolvidos no sistema renina angiotensina são, enzima conversora de angiotensina (ACE ou ECA), angiotensina II, os receptores de angiotensina II, que são do tipo 1 (AT1) e do tipo 2 (AT2). Também existe um eixo contrarregulatório que envolve a ECA-2 ou ACE-2, o peptídeo biologicamente ativo Ang-(1-7) e o receptor MAS (GERMANO BARP; BONAVENTURA; ASSREUY, 2021).

De forma clássica, a angiotensina II estimula o córtex da glândula adrenal a secretar um hormônio esteróide chamado aldosterona, que por sua vez ativa o receptor de mineralocorticoide (MR) no rim para regular o equilíbrio de sódio no organismo. Neste sistema ainda temos a ação direta da angiotensina II sobre os vasos através de receptores de membrana para ang II, AT1 e a ação direta da aldosterona através de receptores intracelulares de aldosterona, os MR, e estes contribuirão para o controle da pressão sanguínea, remodelamento vascular e desenvolvimento de doenças cardiovasculares (LU et al., 2019).

Ainda segundo LU et al., 2019 muitos dos efeitos patofisiológicos da ativação do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA) serem mediados diretamente pela ativação de AT1 e MR nas células músculo liso vascular (MLV) resultando em

melhorada/aumentada vasoconstrição, proliferação de células do MLV e fibrose vascular. A ativação em excesso destes receptores contribui para o envelhecimento cardiovascular e o desenvolvimento das mais comuns doenças cardiovasculares como ataque cardíaco (infarto), acidente vascular cerebral e insuficiência cardíaca (LU et al., 2019). O MR regula classicamente funções celulares agindo como um fator de transcrição ativado por ligante para modular a expressão gênica, chamamos a este efeito lento de efeito genômico. Quando a modulação é através da sinalização celular no citoplasma, o efeito é rápido e chamamos de não genômico (MCCURLEY et al., 2013).

Níveis elevados de aldosterona tem sido relacionado como preditores para aumento de risco para doenças cardiovasculares, como ataques cardíacos, acidentes vasculares cerebrais e morte e os antagonistas dos receptores MR preveniram esta mortalidade associada à níveis aumentados de aldosterona (MCCURLEY et al., 2013). A ativação do MR é estimulada por danos endoteliais, sinalização AngII e ligação de aldosterona levando à sinalização através de mecanismos genômicos e não genômicos. Esta sinalização causa uma contração vascular melhorada, inflamação e remodelação resultando em hipertensão, aterosclerose e envelhecimento vascular. (MCCURLEY et al., 2013).

Baixas concentrações de testosterona foram relacionadas a aumento do *stress* oxidativo e a uma redução da capacidade antioxidante no homem, potencialmente como mecanismo de distúrbio de fluxo devido a danos vasculares e perda de reatividade (KELLY; JONES, 2013)(MANCINI et al. 2008).

Testosterona

Mesmo após vários anos dedicados à pesquisa relacionados aos efeitos da testosterona, ainda permanece sem um consenso específico sobre suas benesses ou seus efeitos deletérios sobre o sistema cardiovascular, sobretudo sobre a reatividade vascular. Estudos já indicam que, a administração de testosterona, em níveis supra fisiológicos promovam efeitos deletérios.

Receptores vasculares para testosterona

A testosterona pode ser convertida em di-hidrotestosterona (DHT) pela enzima 5-alfa redutase ou em estradiol sob a ação da enzima do grupo do citocromo p-450, a aromatase. A DHT tem mais afinidade com os receptores de andrógenos (AR), sendo o andrógeno mais ativo. No plasma, sua concentração é muito baixa se comparada às concentrações da testosterona já que os testículos de adultos produzem mais testosterona que DHT, mesmo que os níveis possam variar pelo ciclo circadiano e estresse (LORIGO et al., 2019).

As ações da testosterona e do DHT requerem a presença de receptores de andrógenos (AR) funcionais. Após a ligação desses hormônios aos receptores, ocorre a transcrição de genes específicos em tecidos-alvo.

Apenas 2-3% da testosterona circula livre na corrente sanguínea. Os andrógenos livres atravessam a membrana das células-alvo por difusão, e se ligam com alta afinidade aos AR intracelulares. A ligação dos andrógenos aos AR gera ações específicas como: 1) dissociação de proteínas inibitórias associadas ao receptor, como a heat-shock protein 90 (HSP90), ativando o complexo; 2) transporte intranuclear do complexo andrógeno/ receptor; 3) dimerização do receptor; 4) ligação com elementos de resposta hormonal (HRE) e 5) associação com vários co-fatores transcricionais, resultando no estímulo da transcrição de genes ligados aos elementos de resposta; essas respostas geram mudanças conformacionais no receptor e alteração na proteína, o que permitirá sua interação e iniciar seus efeitos biológicos (MENDONÇA et al., 2005).

O AR faz parte de uma família de fatores de transcrição nuclear nos quais estão presentes também os receptores de estrógeno, receptores do hormônio tireoidiano, receptores da vitamina D, ácido retinóico e glicorticóides, da progesterona, além dos receptores de mineralocorticóides (MENDONÇA et al., 2005).

A testosterona é um hormônio vasoativo que pode apresentar ações agudas vasodilatadoras em vários leitos vasculares (KELLY; JONES, 2013). Entretanto, não está claro a ação em longo prazo da testosterona, sobre a regulação do tônus vascular.

Na maioria dos casos, estudos experimentais com animais indicando que a testosterona induz o relaxamento vascular sugere que isso ocorre através de mecanismos não-genômicos rápidos e que essas ações são independentes do

endotélio em uma variedade de leitos vasculares, incluindo artérias coronárias, mesentéricas, ilíacas, renais e femorais. Em contraste, outros estudos mostraram que as denudações endoteliais inibem significativamente o relaxamento mediado por testosterona na artéria mesentérica de ratos e artéria pulmonar humana isolada, com diminuição da sensibilidade à vasodilatação induzida por testosterona. O mecanismo-chave subjacente às ações vasodilatadoras potenciais da testosterona tem sido proposto por vários estudos para envolver um efeito na função do canal iônico das células musculares lisas, influenciar a abertura do canal de potássio e/ou a inativação do canal de Ca^{2+} (KELLY; JONES, 2013).

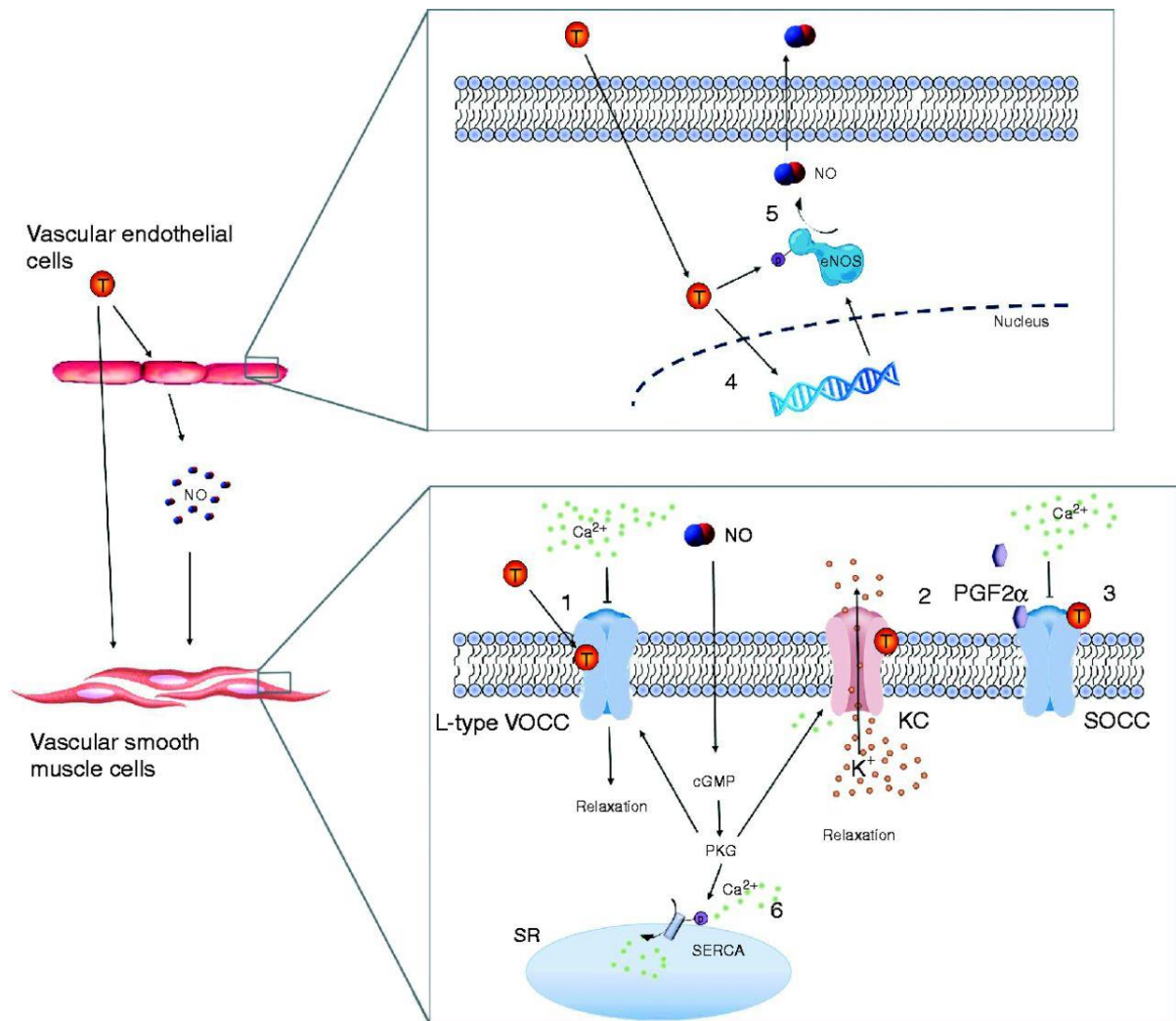


Figura 4 Potenciais mecanismos pelos quais a testosterona influencia a reatividade vascular. Os mecanismos de testosterona independentes do endotélio são considerados como ocorrendo principalmente através da inibição de canais Ca^{2+} operados por voltagem (VOCCs) e/ou ativação de canais K^+ (KCs) em células musculares lisas (SMCs). A testosterona partilha o mesmo sítio de ligação molecular que a nifedipina na subunidade $\alpha 1\text{-C}$ dos canais Ca^{2+} tipo L para causar bloqueio dos canais em concentrações fisiológicas, restringindo assim o influxo de Ca^{2+} e induzindo vasodilatação (1).

Alguns estudos sugerem que as concentrações farmacológicas de testosterona podem ativar a abertura dos canais de Ca^{2+} e induzir vasoconstrição através do aumento do influxo de Ca^{2+} . Em alternativa, a testosterona ativa os canais de K^{+} operados por voltagem e/ou grande condutância, canais de K^{+} ativados por Ca^{2+} , aumentando o efluxo intracelular de K^{+} para induzir hiperpolarização e subsequente relaxamento (2). A testosterona também pode inibir o influxo intracelular de Ca^{2+} através de canais de Ca^{2+} ativados em loja (SOCCs), bloqueando a resposta à prostaglandina $\text{F}2\alpha$ ($\text{PGF}2\alpha$) (3). As ações dependentes do endotélio da testosterona podem ser efeitos genômicos e não genômicos a longo prazo. A testosterona aumenta a expressão da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e aumenta a produção de óxido nítrico (NO) (4). Se estas ações são através da ligação direta dos receptores de androgênio, a aromatização à ativação dos receptores de estradiol e estrogênio, ou a interação com vias alternativas de sinalização intracelular permanece desconhecida. Além disso, foi demonstrado que o tratamento com testosterona aumenta a atividade de eNOS, aumentando potencialmente a fosforilação através da ativação não-genômica das vias de sinalização intracelular e do influxo de Ca^{2+} (5). O aumento do NO atua sobre os SMC para induzir relaxamento ativando o GMPc, que por sua vez ativa as quinases proteicas dependentes de GMPc (PKG) (6). PKG fosforilatos e ativa o retículo sarcoplasmático Ca^{2+} -ATPase (SERCA), que aumenta a absorção de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático superficial (SR) e, portanto, diminui o Ca^{2+} global da célula. A PKG também aumenta a liberação de Ca^{2+} no espaço submembrana onde a ativação dos canais K^{+} se segue e o PKG pode inibir adicionalmente a atividade dos canais de Ca^{2+} diretamente para causar relaxamento. T, testosterona (KELLY; JONES, 2013)

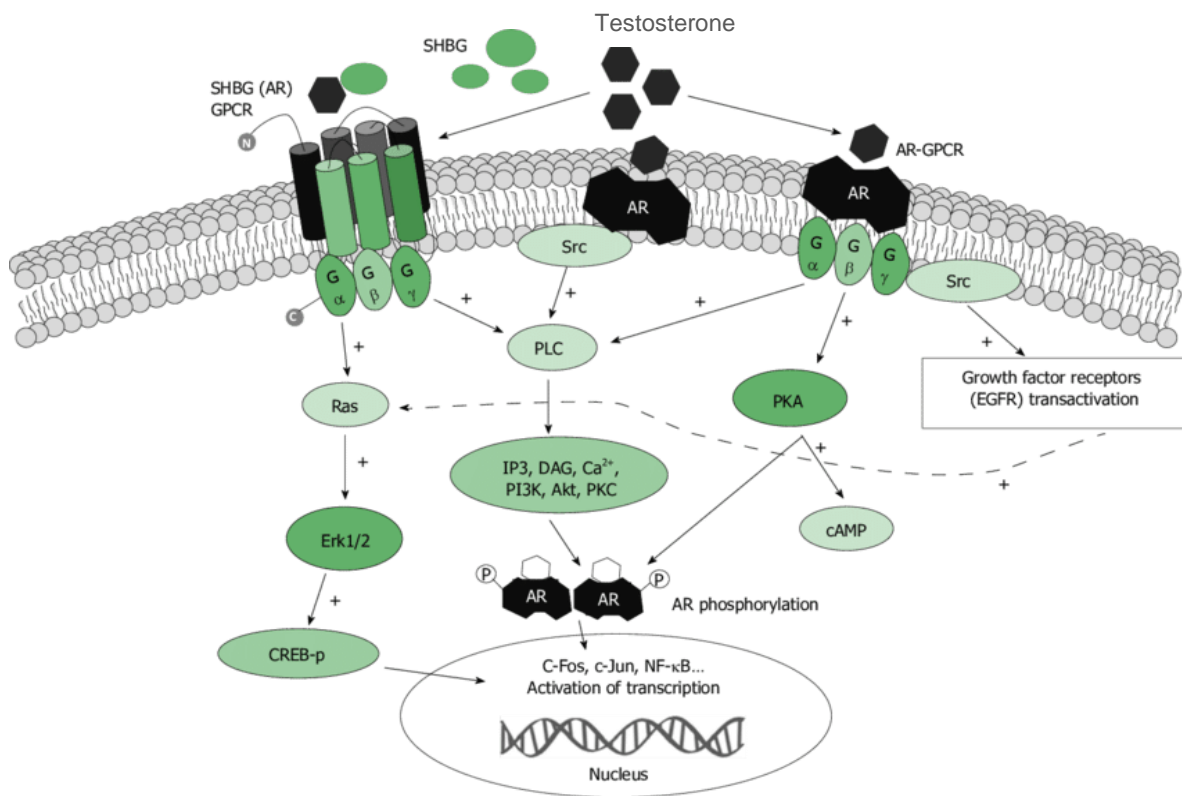


Figura 5- Esquema das vias de sinalização extra-nuclear ativadas por testosterona (SUKOCHEVA, 2015). Apresentação esquemática dos caminhos de sinalização extra-nuclear ativados por testosterona. A testosterona se liga ao (s) receptor(es) androgênico(s) associado(s) a membrana não definida(s) (mAR) que pode(m) transduzir a sinalização ajusante para a fosfolipase c (PLC). A ativação do PLC produz vários segundos mensageiros, incluindo $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (IP_3) e DAG. Ca^{2+} leva então a um aumento do fluxo intracelular de Ca^{2+} . Alternativamente, no caminho ERK, a Testosterona se liga ao receptor associado à membrana, que se associa e ativa a Src kinase. Em um terceiro mecanismo proposto, SHBG-AR GPCR ativa Ras, que por sua vez ativa a cascata de fosforilação. O ERK via fosforilatos CREB para modular a expressão gênica. AR: receptor de androgênio associado à membrana; CREB: proteína de ligação do elemento de resposta cAMP; DAG: diacilglicerol; GPCR: G-

protein-coupled receptor; IP3: Inositol trisfosfato; PLC: Fosfolipase C; SRC: Src kinase; RAS: Proteína RasGTPase; +: Indica efeito positivo na ativação.

1.1.5 Hipótese

Apoiamos nossos estudos sobre a hipótese de que a regulação em longo prazo, do tônus vascular, seja mediada pela testosterona, através da modulação da angiotensina e da aldosterona.

2 JUSTIFICATIVA

Estudos têm associado a testosterona e seus efeitos sobre o sistema cardiovascular e renina angiotensina aldosterona. Alguns estudos mostram uma associação entre baixos níveis de testosterona em homens e a hipertensão arterial, a doença coronária e o infarto do miocárdio. A administração aguda de testosterona foi capaz de diminuir o tônus vascular, mas, a longo prazo, os efeitos de androgênios parecem ser associados a vasoconstrição pela *up regulation* da expressão do tromboxano A₂, síntese de norepinefrina, expressão da Angiotensina II e ação da endotelina-1 (KIENITZ; QUINKLER, 2008).

Assim, considerando que efeitos da testosterona sobre o SCV, ainda permanecem sem um consenso e principalmente seus efeitos sobre a reatividade dos vasos, neste estudo vamos avaliar a participação dos hormônios sexuais masculinos, sobre a reatividade da aorta de ratos wistar machos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação modulatória da testosterona, dependente do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), sobre a reatividade vascular em anéis de aorta.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar se a castração modula a resposta vascular em anéis de aorta de ratos wistar;
- Avaliar a resposta vascular mediada por angiotensina II (via receptores AT1), aldosterona e estresse oxidativo (pela via da NADPH oxidase) em anéis de aorta de ratos wistar;
- Identificar se os níveis de malondialdeído (MDA) em plasma sanguíneo de ratos wistar foram alterados pela castração;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O uso e o cuidado dos animais experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos da pesquisa com animais estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA com protocolos experimentais sujeitos à análise da Comissão de Ética em Pesquisa com Animais – CEUA da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA UFES 17/2020).

4.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), pesando entre 240 a 260 g (N=128), cedidos pelo biotério da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Os animais foram divididos em gaiolas com 3 animais por gaiola com forração de maravalha macia absorvente e atóxica (Resolução Normativa CONCEA n°33 de 18/11/2016). Visando atender à Resolução Normativa n°15 de 16/12/2013, os animais foram mantidos em grupos, conforme recomendação do CONCEA, destinando cerca de 187,05cm² (peso entre 200 e 300 g) por animal e chegando à uma área de aproximadamente 451,5 cm² conforme o desenvolvimento dos animais. As gaiolas tinham dimensões aproximadas de 30x20x18 cm. Os animais foram mantidos sob condições salubres de temperatura e umidade (entre 20-25°C), com livre acesso à

água potável e ração própria para roedores, mantendo ciclos de claro e escuro de 12h de acordo com as especificações CONCEA.

4.3 MODELO EXPERIMENTAL

Para realização dos protocolos experimentais os animais foram divididos de forma aleatória em dois grupos principais: castrados/orquidectomizados (OQT) e não castrados/inteiros considerados controle (SHAM).

4.3.1 Procedimento cirúrgico

Os animais foram submetidos à procedimento cirúrgico para castração, sob anestesia com protocolo ketamina 10% (60-90 mg/kg, i.p.; laboratório Pfizer) e Cloridrato de Xilazina a 10% (10mg/kg, i.p.; Sedomin® do laboratório Kömig); após verificação dos sinais de estado anestésico, sendo estes principalmente avaliação da profundidade do plano anestésico até a perda do reflexo interdigital após estímulo doloroso e reflexo córneo palpebral, conforme orientação da Resolução Normativa nº 33, de 18 de Novembro de 2016 do CONCEA. Foi realizada uma incisão longitudinal na bolsa escrotal com exposição dos testículos, e remoção dos mesmos bilateralmente.

Para animais do grupo SHAM houve mimetização do procedimento cirúrgico da castração, portanto, incisão na bolsa escrotal, exposição dos testículos, mas não houve extirpação dos mesmos.

Após, foi realizada hemostasia e rafia da bolsa escrotal por sutura simples, e ao final do procedimento cirúrgico, a recuperação anestésica foi monitorada através de manutenção de temperatura em placa aquecedora, padrão respiratório e sons respiratórios, e foram mantidos em sala com temperatura entre 20-25°C. Ao final da cirurgia, os animais receberam dose única de Enrofloxacino 10% (10mg/kg – s.c) e dose de Flunixin Meglumine (2 mg/kg s.c); todos os medicamentos foram prescritos pelo veterinário responsável do biotério central da UFES, Rodolpho José da Silva Barros.

Quando despertos, após efeito de anestesia os animais foram acomodados em gaiolas com livre acesso a ração e água potável.

4.3.2. Intervenções crônicas

24 horas após cirurgia, iniciou-se a suplementação com dose de losartan, um bloqueador de receptor para angiotensina II (15 mg/kg, s.c) nos grupos SHAM+LOS e OQT+LOS, espironolactona, um antagonista de receptor para mineralocorticoide, (80 mg/kg, gavagem) nos grupos SHAM+SPI e OQT+SPI e Apocinina, um antioxidante, inibidor da NADPH oxidase, (30 mg/kg, diluída em água) nos grupos SHAM+APO e OQT+APO. Foram administradas doses diárias por 12 semanas, corrigindo-se as doses pelos pesos dos animais semanalmente.

4.3.3. Intervenções agudas

Após 12 semanas os animais foram eutanasiados e feitas incubações com NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), inibidor da sintase de óxido nítrico (100µM, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), indometacina (INDO) inibidor não seletivo da ciclooxigenase (COX) e denudação da camada endotelial do vaso (E-).

4.3.4. Isolamento de anéis de aorta

Após 12 semanas, os animais foram anestesiados, após confirmação de estado de anestesia, foi realizada laparotomia, exposta aorta abdominal, coletados 3-4 mL de sangue total em tubo à vácuo com heparina, para posterior coleta de plasma por centrifugação a 3500 rpm por 20 minutos. Após coleta foi feita toracotomia, expondo cavidade torácica; foi realizada retirada do coração pinçando-o pelo arco aórtico com pinça delicada simples de pontas curvas e feita a retirada deste e colocado em solução de Krebs. A seguir procedeu-se a retirada da aorta torácica com gordura perivascular pinçando-o com a mesma pinça e com tesoura delicada, realiza-se o corte longitudinal da aorta fazendo-o o mais rente quanto possível da coluna vertebral do animal para garantir a integridade da artéria; também deve ser observada a tração feita com a pinça curva, esta não deve ser excessiva objetivando não prejudicar o tecido da artéria a ser estudada.



Figura 6– Aorta torácica de ratos wistar antes de ser seccionada em anéis; Fonte: arquivo pessoal. Foto: Michele Hortelan

As aortas foram colocadas rapidamente em placa de Petri e imersa em solução de Krebs-Henseleit gelada, composta por (em mM): NaCl 127; KCl 4,7; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2; KH_2PO_4 1,17; NaHCO_3 24; Glicose 11; EDTA 0,01; esta mesma placa de petri, com a artéria dissecada, foi colocada sobre uma placa gelada enquanto a aorta foi seccionada em vários anéis de 3-4mm. A artéria teve o tecido gorduroso perivascular removido mecanicamente com cuidado para não lesar endotélio. Dois fios de aço inoxidável, em forma de triângulos, foram passados através do lúmen dos segmentos de forma a ficar paralelos na luz do vaso. Cada anel vascular foi colocado em cubas contendo 5 mL de solução de Krebs-Henseleit aquecida a $36,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$, continuamente gaseificada com mistura carbogênica, mantendo o pH 7,4. Um dos fios foi fixado à um gancho no assoalho da cuba de vidro destinada ao banho de órgãos e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica; assim, qualquer alteração do diâmetro do vaso foi captada pelo transdutor de força (GRASS® Force-displacement transducer FT03, Mass) conectado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems, Inc; CA) e este a um computador.

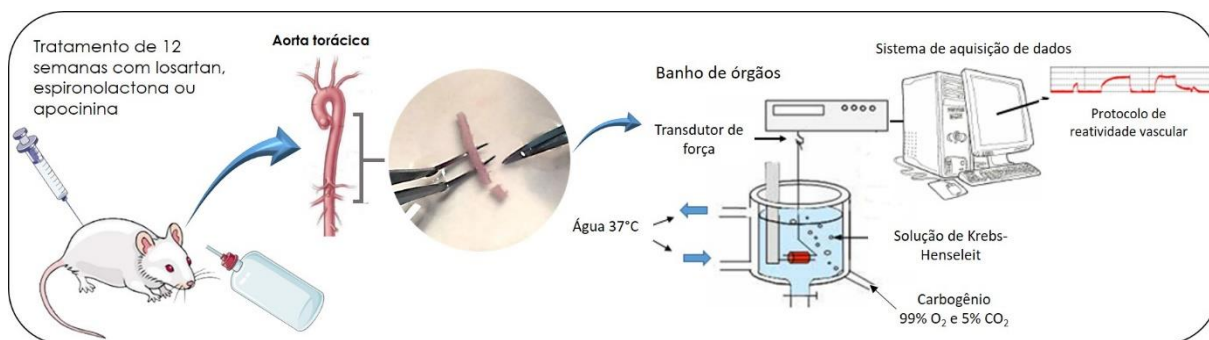


Figura 7– Anéis isolados de aorta de ratos tratados: preparação dos anéis para avaliação da reatividade vascular *in vitro* no Sistema de aquisição de dados. Fonte: Modificado de Simões, 2019. (SIMÕES, 2019)

Após a montagem, os anéis aórticos foram submetidos à uma tensão de repouso de aproximadamente 1 g (intervalo de 0,88 – 1,2 g), lavados 1 vez, e depois regulada a tensão destes anéis até a estabilização; foi considerada estabilização quando os anéis permaneceram sem alteração de tensão. Após período aproximado de 30 minutos de estabilização, foi adicionado ao banho KCl (75 mM – 125 µL) para verificar a atividade contrátil do músculo liso vascular induzida por despolarização. Depois que atingirem uma variação de 1 g de força a partir do valor basal, estes anéis foram lavados três vezes com solução de Krebs-Henseleit até retornarem a tensão de repouso.

Após 30 minutos de estabilização, uma nova dose de KCl (75 mM 125 µL) foi adicionada ao banho para a aquisição de uma contração máxima do músculo liso vascular, aferida no período de 30 minutos, tempo necessário para atingir um platô no registro da contração. Após este platô, os anéis foram novamente lavados três vezes para atingir o valor basal (0,88 a 1,2 g) e, após 30 minutos esses anéis foram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio. A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico Ach. Para tal, os anéis de aorta foram pré-contráidos com fenilefrina 10^{-7} M (concentração que induzirá aproximadamente 50% da contração máxima ao KCl 75 mM). Uma vez atingido o platô, uma dose única de acetilcolina (10^{-5} M) foi aplicada. Os anéis que relaxarem menos que 70% do platô foram descartados. Os anéis sem endotélio devem relaxar no máximo 10%. Após a avaliação da integridade funcional do endotélio, os anéis foram lavados três vezes para atingir o valor basal.

O efeito da testosterona foi investigado na reatividade vascular e calculado como o percentual de resposta ao KCl (75 mM). Para isto, foi realizada curva concentração-

resposta à fenilefrina (10^{-11} a 10^{-3} M) de maneira cumulativa nos dois grupos estudados.

Com a finalidade de avaliar a capacidade do endotélio em modular a resposta constritora à fenilefrina, foram utilizados nos protocolos experimentais anéis de aorta com endotélio íntegro (E) e sem endotélio (E-). As células endoteliais foram removidas mecanicamente através do uso de instrumental cilíndrico metálico, inseridos na luz do vaso e friccionados à sua íntima, ocasionando lesão do endotélio. A ausência do endotélio foi confirmada pela incapacidade da acetilcolina 10^{-5} M induzir o relaxamento após a pré-contração com fenilefrina.

A preparação foi lavada três vezes e, após estabilização com retorno à tensão basal, foram realizadas curvas concentração- resposta à fenilefrina (10^{-11} a 10^{-3} M).

4.3.5. Método para medida de peroxidação lipídica - medida da formação de substâncias reativas ao ácido tiobatbitúrico (TBARS) – Malondialdeído (MDA) plasmático.

Para avaliar a peroxidação lipídica induzida pela ausência de níveis fisiológicos de testosterona, foi medida a concentração plasmática de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), principalmente o malondialdeído. Estes são produtos da oxidação de ácidos graxos de membranas células e lipoproteínas, portanto sua concentração é proporcional ao nível de oxidação destas moléculas; para isso utilizamos plasma sanguíneo.

4.3.6. Coleta do plasma

No momento da eutanásia dos animais, foi realizada a laparotomia abdominal, coletados 3-4 mL de sangue arterial total da aorta abdominal em tubo heparinizado, centrifugado a 3500 rpm por 20 minutos. O plasma foi coletado e guardado em microtubos de 2 ml e guardado em ultra-freezer com temperatura de -80°C .

4.3.7. Protocolo MDA

Coletou-se 500 µl do plasma em um microtubo 1,5 µL, adicionou-se 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) diluído em HCl 0,6 M. As amostras foram homogeneizadas em vórtex e colocadas em geladeira entre +2°C e +8°C por 20 minutos. Após centrifugar as amostras a 4510 rpm por 15 minutos a 4°C; coletou-se 500 µL do sobrenadante da amostra e acondicionou-se em um microtubo de 1,5 µL e a este acrescentou-se 100 µL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) + Tris 260 mM pH 7,0; levou-se ao aquecimento a 95°C por 30 minutos. Coletou-se 200 µL destas amostras e colocou-se em duplicata em uma microplaca para leitura de absorbância; dois poços da placa continham 500 µL de TCA + 500 µL de PBS 0,2 M pH a 7,3 denominado como branco na placa. Os resultados da análise de absorbância em Leitora de Microplaca para Absorbância ELx808 (Biosystems) a 540 nm foram expressos como ηmol/L.

FÁRMACOS E REAGENTES UTILIZADOS

- Acetilcolina, Cloridrato (Sigma)
- Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Merck)
- Ácido hidroxietilpiperazina (HEPES) (Sigma)
- Bicarbonato de sódio (Vetec)
- Cloreto de cálcio dihidratado (Merck)
- Cloreto de potássio (Merck)
- Cloreto de sódio (Merck)
- Fenilefrina, hidrocloreto (Sigma)
- Fosfato de Potássio Monobásico (Merck)
- Glicose (Merck) - Iberiotoxina (Sigma)
- L-Fenilefrina, Hidrocloreto (Sigma)
- Losartan (Sigma)
- N^ω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Sigma)
- Espironolactona
- Apocinina

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores de resposta máxima (R_{máx}) e de pD₂ (-log EC₅₀) das curvas concentração-resposta à fenilefrina nas situações experimentais (remoção do

endotélio ou na presença de fármacos) foram calculados através da análise de regressão não-linear de cada curva individualmente. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Os valores de “n” representam o número de animais utilizados em cada protocolo experimental.

As análises estatísticas dos resultados foram: teste t de *student* e análise variância (ANOVA), uma via, medidas repetidas ou completamente randomizadas. Quando a ANOVA apresentar significância estatística, o teste *post-hoc* de Bonferroni ou Tukey foi realizado (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, E.U.A). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Dados ponderais

Tabela 1 - Peso corporal.

grupos	n	Peso inicial	Peso final
SHAM	15	255,7 \pm 5,7	487,1 \pm 11,7*
OQT	12	232,9 \pm 9,4	391,6 \pm 11,3 *#
SHAM+APO	8	271,4 \pm 19,9	544,4 \pm 22,1 *#
OQT+APO	10	234,2 \pm 19,6	442,5 \pm 12,0 *&@
SHAM+LOS	14	263,9 \pm 19,8	484,1 \pm 13,5*
OQT+LOS	12	248,7 \pm 11,5	404,8 \pm 16,5*\$
SHAM+SPI	15	270,5 \pm 25,2	501,3 \pm 17,4*
OQT+SPI	14	265,1 \pm 22,06	446,4 \pm 9,966 *@

Pesos dos animais após 12 semanas de tratamento; valores apresentados como média \pm SEM; n=número de animais; SHAM, ratos não castrados; OQT, ratos orquidectomizados; SHAM+APO, ratos não castrados tratados com apocinina; OQT+APO, ratos orquidectomizados tratados com apocinina; SHAM+LOS, ratos não castrados tratados com losartan; OQT+LOS, ratos orquidectomizados tratados com losartan; SHAM+SPI, ratos não castrados tratados com espironolactona; OQT+SPI, ratos orquidectomizados tratados com espironolactona; significância foi avaliada usando teste T de *student*'s não paramétrico; * $p < 0,05$ vs. Peso inicial. Peso final: significância avaliada com *Anova one way*; # $p < 0,05$ vs SHAM; & $p < 0,05$ vs SHAM+APO. \$ $p < 0,05$ vs SHAM+LOS. @ $p < 0,05$ vs OQT.

Ganho de peso - Tratamento Crônico

A castração dos animais mostrou redução do ganho de peso em relação ao grupo controle não castrado; na figura 8, podemos observar que a castração impediu que os animais apresentassem o mesmo ganho de peso que os grupos não castrados. Nos ratos do grupo SHAM, o ganho de peso foi de 231,5 \pm 11,24 g n=15, e nos animais OQT o ganho foi de 158,4 \pm 13,0 g n=12*, $p < 0,01$, indicando que a orquidectomia impediu o ganho de peso dos animais. O mesmo foi observado nos animais castrados tratados com apocinina (OQT+APO, 208,3 \pm 15,5 g n=10), os tratados com losartan

(OQT+LOS $156,0 \pm 23,0$ g $n=12$), assim como para animais tratados com espirolactona (OQT+SPI, $180,5 \pm 20,60$ $n=10$) (figura 8), que também apresentaram redução do ganho de peso. Estes resultados sugerem o impacto da orquidectomia sobre o ganho de peso no grupo OQT, indicando a participação dos hormônios sexuais no ganho de peso dos animais.

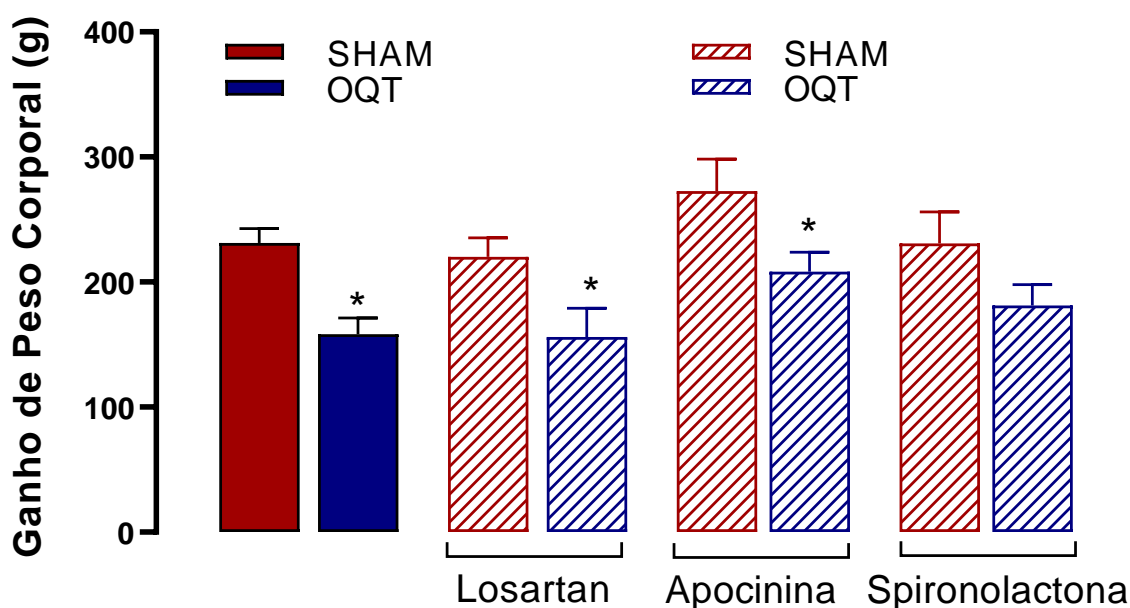


Figura 8- Ganho de peso corporal dos animais após 12 semanas de tratamento; valores apresentados como média \pm SEM; n =número de animais; SHAM, ratos não castrados (vermelho); OQT ratos orquidectomizados (azul); SHAM+Apo, ratos não castrados tratados com apocinina; OQT+APO, ratos orquidectomizados tratados com apocinina; SHAM+LOS, ratos não castrados tratados com losartan; OQT+LOS, ratos orquidectomizados tratados com losartan; SHAM+Spi, ratos não castrados tratados com espirolactona; OQT+Spi, ratos orquidectomizados tratados com espirolactona; significância foi avaliada usando teste T de *student's* não paramétrico; * $p < 0,05$ SHAM vs. OQT.

Tabela 2 - Efeito do tratamento crônico com apocinina (APO), espirolactona (SPI) e losartan (LOS) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar machos orquidectomizados (OQT) e não castrados/orquidectomizados (SHAM).

Grupos	n	R _{máx} (%)	pD ₂ – log EC ₅₀
SHAM	8	109,4 \pm 9,56	-6,337 \pm 0,13
SHAM APO	7	126,9 \pm 9,83	-6,520 \pm 0,21
SHAM LOS	10	127,5 \pm 5,63	-6,579 \pm 0,14
SHAM SPI	10	120,4 \pm 7,56	-6,540 \pm 0,15
OQT	9	120,5 \pm 10,06	-6,240 \pm 0,15
OQT APO	7	118,6 \pm 11,71	-6,387 \pm 0,14

OQT LOS	8	135,6 ± 4,74	-7,218 ± 0,23*
OQT SPI	9	87,46 ± 9,33* #	-6,546 ± 0,09

* $p < 0,05$ vs OQT; Valores expressos como média ± Erro Padrão da Média analisados com análise de variância (ANOVA uma via), pós teste de Tuckey e *test t Student*.

5.2. Efeito da orquidectomia sobre a resposta vascular à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos wistar.

Tabela 3 - Efeito das intervenções agudas *in vitro* com Losartan (LOS), indometacina (INDO), denudação do endotélio (E-), a manutenção da gordura perivascular (PVAT) à fenilefrina em anéis de aorta de ratos wistar machos orquidectomizados (OQT) e não castrados (SHAM).

Grupos	n	R _{máx} (%)	pD ₂ – log EC ₅₀
SHAM	12	118,3 ± 8,04	-6,329 ± 0,11
SHAM LN	10	164,6 ± 12,02*	-6,795 ± 0,12*
SHAM E-	9	172,8 ± 10,80*	-6,981 ± 0,09*
SHAM INDO	12	56,27 ± 6,61*	-6,340 ± 0,10
SHAM PVAT	9	51,98 ± 10,16*	-5,505 ± 0,12*
OQT	15	119,8 ± 8,41	-6,578 ± 0,22
OQT LN	10	165,5 ± 20,13*	-7,004 ± 0,13
OQT E-	10	174,4 ± 16,04*	-7,144 ± 0,15*
OQT INDO	14	72,64 ± 9,34*	-6,580 ± 0,08
OQT PVAT	12	57,59 ± 6,45*	-5,378 ± 0,11*

* = $p < 0,05$ vs controle dentro do grupo; # $p < 0,05$ – diferença entre os grupos SHAM e OQT; ns – não significante estatisticamente. Valores expressos como média ± Erro Padrão da Média analisados com análise de variância (ANOVA uma via), pós teste de Tuckey e *test t student*.

Intervenções crônicas

Nossos resultados mostraram que a R_{máx} e o LogEC-50 (tabela 3 e figura 9) das curvas de contração à fenilefrina, não foram diferentes entre o grupo castrado e não castrado. Estes dados sugerem que, a redução dos níveis de testosterona durante 3 meses não foi capaz de modificar a reatividade vascular à fenilefrina.

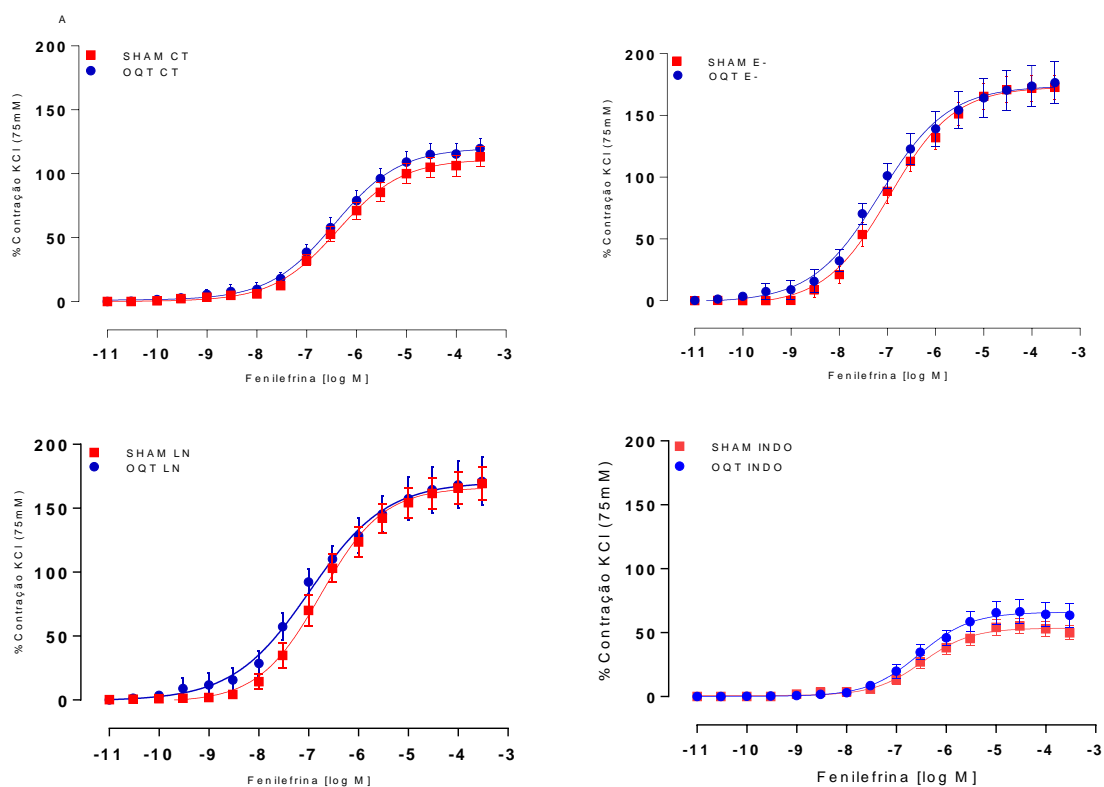


Figura 9- Curva de contração à fenilefrina (% de contração ao KCl 75mM) em anéis de aorta mantidos com endotélio e sem endotélio (E-), incubados com L-Name (LN) e incubados com Indometacina (INDO); valores apresentados como média \pm SEM; n=número de animais; SHAM, ratos não castrados; OQT, ratos orquidectomizados; SHAM E-, anéis sem endotélio; OQT E-, ratos orquidectomizados anéis sem endotélio; SHAM LN, anéis de aorta de ratos não castrados incubados com LN; OQT LN, anéis de aorta de ratos castrados incubados com LN; SHAM INDO, anéis de aorta de ratos não castrados incubados com indometacina; OQT INDO, anéis de aorta de ratos castrados incubados com indometacina.

As curvas concentração-resposta a fenilefrina, dos animais tratados por 12 semanas com apocinina, losartan e espironolactona estão apresentadas na Figura 10. Os tratamentos não modificaram a reatividade dos anéis isolados de aorta do grupo SHAM (Figura 10A). Na figura 10B observamos que os anéis do grupo castrado, tratado com espironolactona, bloqueador do receptor de aldosterona (OQT+SPI), apresentou uma menor R_{max} à fenilefrina comparado ao grupo não tratado (R_{max} OQT= $120,5 \pm 10,06$ vs OQT+SPI= $87,46 \pm 9,33$, $p < 0,05$). Estes dados sugerem que a R_{max} à fenilefrina sofre influência combinada dos HSM e aldosterona, para manter a R_{max} , poderia indicar um papel modulatório conjunto da resposta contrátil vascular mediada pelo receptor α -adrenérgico.

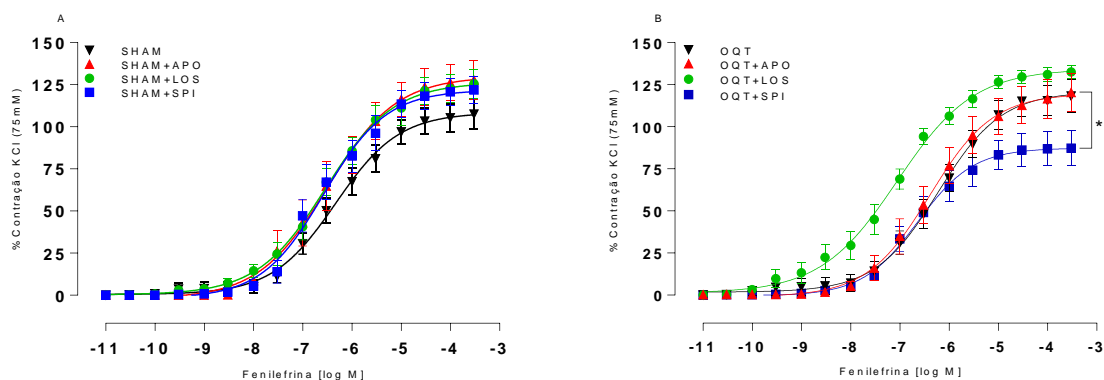


Figura 10- Curva concentração-resposta à fenilefrina em animais tratados por 12 semanas. Animais tratados com losartan (LOS), apocinina (APO) e espironolactona (SPI) nos grupos SHAM (A) e OQT (B). Valores apresentados como média \pm SEM; n=número de animais.* $p < 0,05$ vs. OQT. *test t Student*.

O tratamento com losartan, durante 12 semanas, não modificou a resposta à fenilefrina entre os grupos SHAM e OQT (figura 11B), nem dentro do grupo SHAM (figura 11C). Entretanto o tratamento com losartan, aumentou a sensibilidade ao agonista α -adrenérgico (Log EC-50 - OQT= $-6,240 \pm 0,15$ vs OQT+LOS= $-7,218 \pm 0,23$ $p < 0,05$) no grupo OQT (Figura 14D).

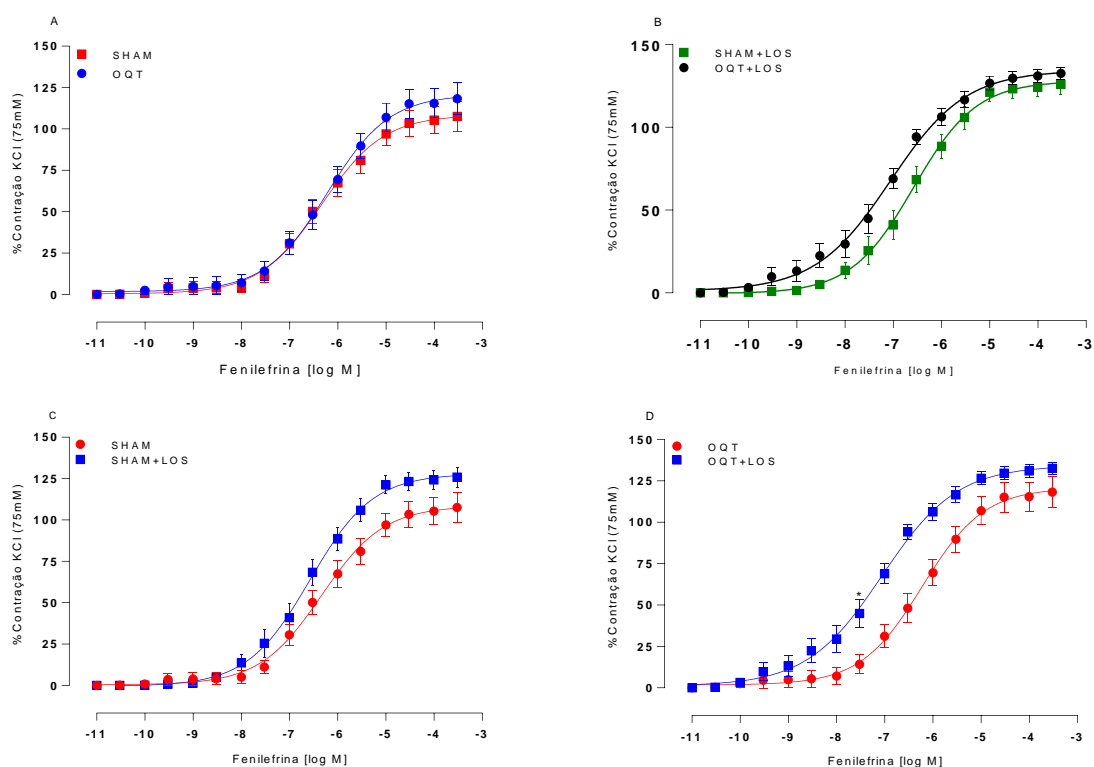


Figura 11- Curva concentração-resposta à fenilefrina em animais tratados por 12 semanas com losartan. OQT: ratos castrados controle; SHAM: ratos não castrados controle; SHAM+LOS: ratos não castrados tratados com losartan; OQT+LOS: ratos castrados tratados com losartan. Valores apresentados como média \pm SEM; n=número de animais. * $p < 0,05$. *Test t Student*.

Ao serem tratados com apocinina, na água de beber, os grupos não apresentaram diferenças entre si, nem mesmo em relação aos seus controles (Figura 12); estes dados sugerem que o tratamento com apocinina, na presença ou ausência de níveis fisiológicos de testosterona não foram alterados.

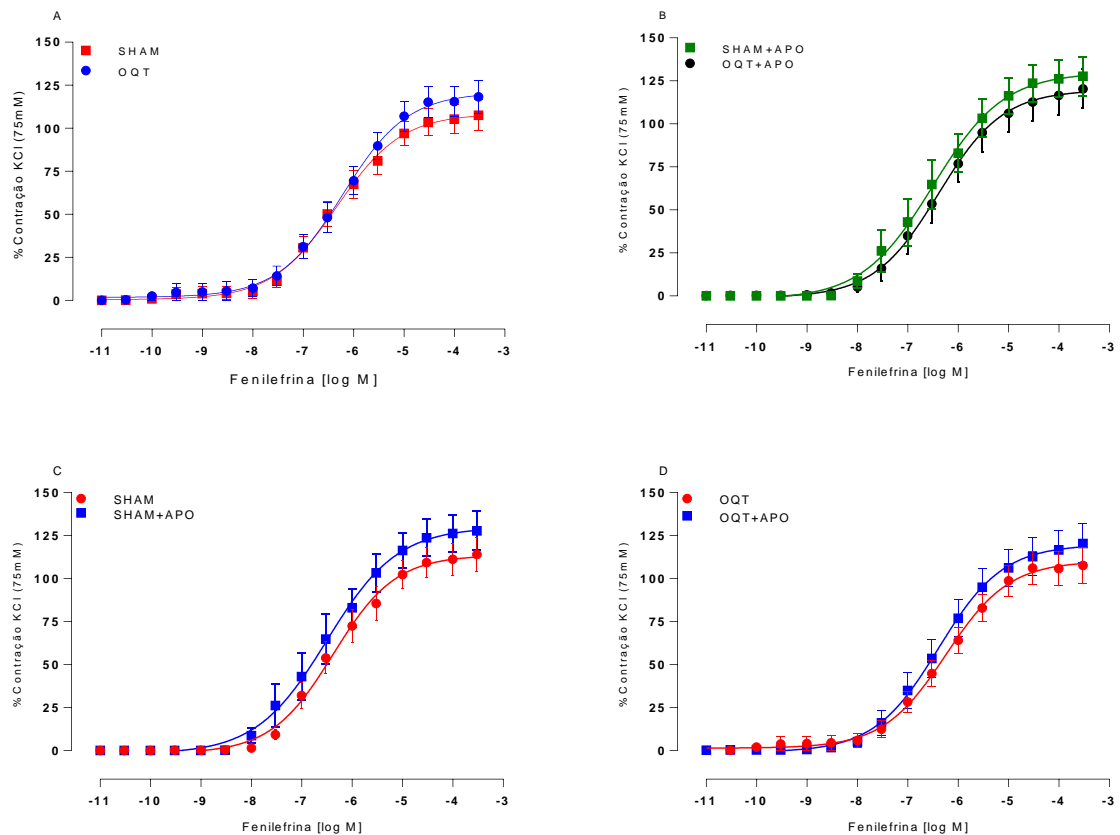


Figura 12- Curva concentração-resposta à fenilefrina em animais tratados por 12 semanas com apocinina; OQT: ratos castrados controle; SHAM: ratos não castrados controle; SHAM+APO: ratos não castrados tratados com apocinina; OQT+APO: ratos castrados tratados com apocinina; valores apresentados como média \pm SEM; n=número de animais *test t Student*.

Para corroborar estes achados, medimos os níveis plasmáticos de malondialdeído (Figura 13) para avaliar a peroxidação lipídica induzida pela castração; ao medir a concentração plasmática de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), principalmente o malondialdeído não encontramos nenhuma diferença entre os níveis plasmáticos de MDA nos castrados e não castrados (Figura 13). Esses dados demonstrando que a castração durante 12 semanas, não modificou a peroxidação lipídica, analisados em conjunto com o achado de o tratamento com apocinina também não modificou a reatividade vascular entre os grupos, sugere a não participação de estresse oxidativo no grupo OQT.

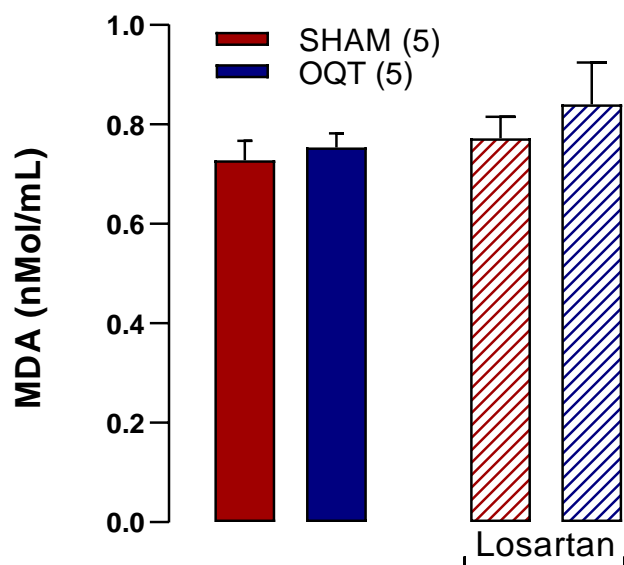


Figura 13- Medida de MDA (nMol/mL) plasmático; OQT (Azul) : SHAM (Vermelho):SHAM + LOS (Hachurado vermelho): ratos tratados com losartan e OQT + LOS (Hachurado azul). Valores apresentados como média \pm SEM. Não houve diferença entre os grupos.

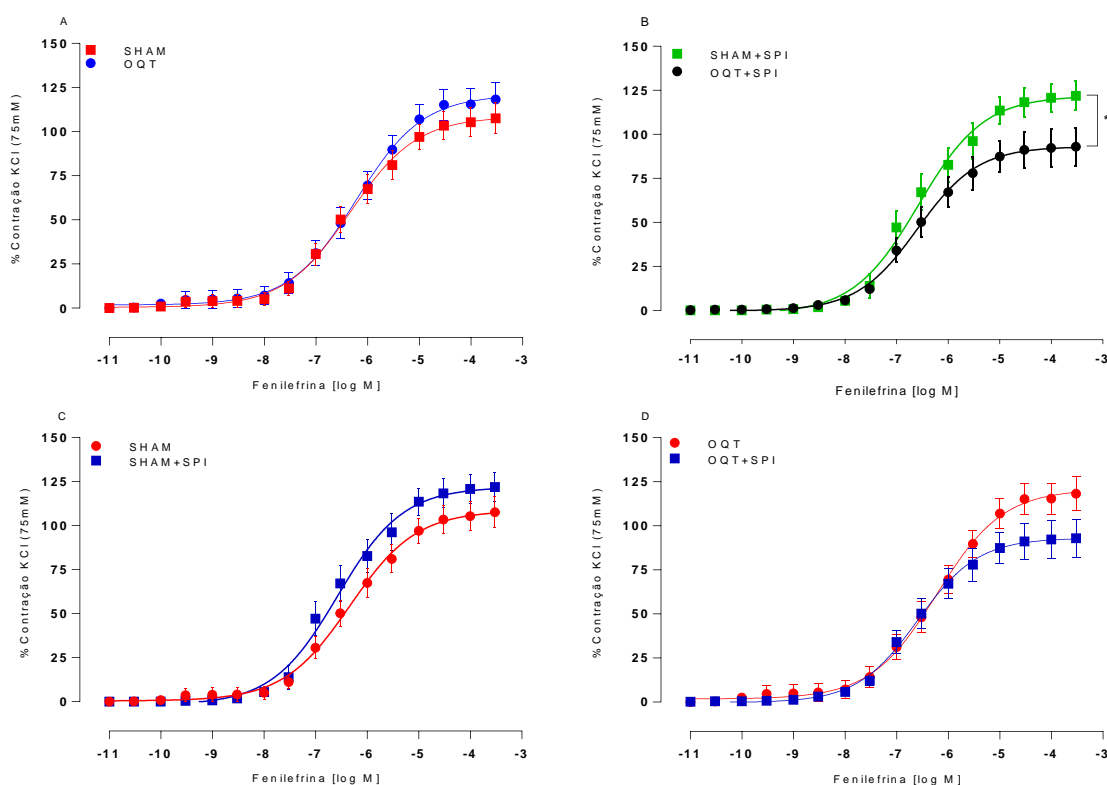


Figura 14- Curva concentração-resposta à fenilefrina em animais tratados com espironolactona (% de contração ao KCl 75mM); valores apresentados como média \pm SEM; n=número de animais; SHAM, ratos não castrados controle; OQT, ratos orquidectomizados controle; SHAM+Spi, ratos não castrados tratados com espironolactona; OQT+Spi, ratos orquidectomizados tratados com espironolactona; CT grupo controle. * $p < 0,05$.

Quando inibimos o receptor para aldosterona, através do tratamento com espironolactona, os resultados mostraram diferença na resposta máxima à felinefrina entre os grupos SHAM e OQT (Figura 14B) OQT vs OQT+SPI (Figura 14D). A R_{max} à fenilefrina foi menor no grupo OQT+SPI em relação ao grupo SHAM+SPI e OQT. Estes dados sugerem que a contração à fenilefrina é modulada pelos níveis fisiológicos de HSM (SHAM+SPI = $120,4 \pm 7,56$ % $n=10$ vs OQT+SPI = $93,28 \pm 10,18$ % $n=10$; * $p < 0,05$). A inibição dos receptores de MR, determinou uma menor contração máxima à fenilefrina nos grupos castrados. Estes resultados sugerem a modulação conjunta desses dois hormônios, testosterona e aldosterona, na R_{max} à fenilefrina.

Intervenções agudas/ *in vitro*

Para avaliar as possíveis vias celulares envolvidas na modulação da reatividade vascular induzidas pela presença ou ausência de níveis fisiológicos de testosterona, utilizamos fármacos e intervenções diretas no segmento de aorta estudado. Quanto aos fármacos utilizamos Indometacina 10^{-2} M, L-NAME, inibidor da sintase de óxido nítrico (100 μ M, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA); quanto às intervenções diretas, desnudamos a camada de endotélio (E^-).

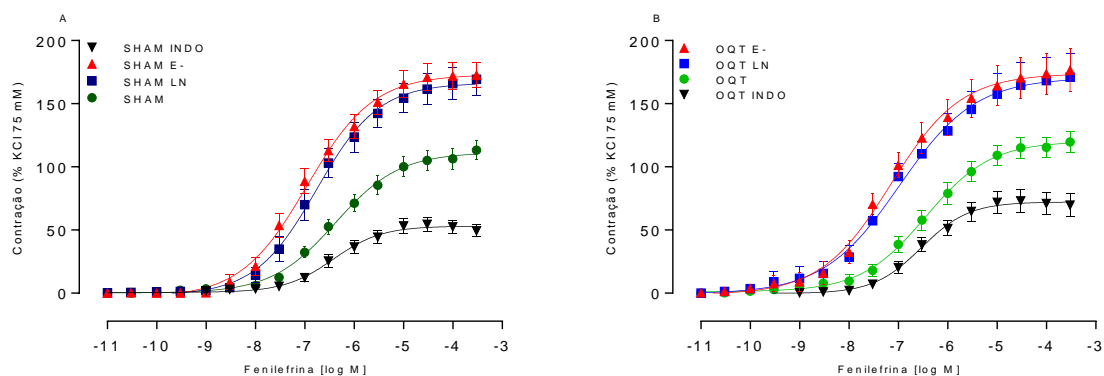


Figura 15- Curva concentração-resposta à fenilefrina grupo controle – Intervenções agudas; SHAM CT, ratos não castrados controle; SHAM INDO, ratos não castrados incubados com indometacina; SHAM E-: ratos não castrados anéis sem endotélio; SHAM L-NAME: ratos não castrados anéis incubados com L-NAME; OQT CT, ratos orquidectomizados controle; OQT INDO, ratos castrados incubados com indometacina; OQT E-: ratos castrados anéis sem endotélio; OQT L-NAME: ratos castrados anéis incubados com L-NAME.

A reatividade vascular dos animais foi avaliada durante a incubação *in vitro* de bloqueadores farmacológicos de vias celulares de interesse e os resultados estão mostrados na figura 15. Testamos a participação do NO vascular, inibindo as enzimas da NOS, por meio do L-NAME, 100 μ M. A reatividade à fenilefrina aumentou, na presença de L-NAME, de maneira semelhante nos grupos SHAM e OQT. A retirada do endotélio vascular promoveu, de maneira idêntica nos dois grupos, aumento da reatividade. A inibição da via COX, com indometacina, determinou redução da Rmax em ambos os grupos (Rmax SHAM= 118,3 \pm 8,04 vs SHAM+INDO = 56,27 \pm 6,61, $p < 0,01$ e OQT= 119,8 \pm 8,41 vs OQT+INDO= 72,64 \pm 9,34, $p < 0,01$). Não houve diferença de reatividade entre os grupos SHAM+INDO e OQT+INDO. Estes dados sugerem a participação semelhante da via da COX, sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina, nos grupos SHAM e OQT.

Efeitos do bloqueio da aldosterona sobre a resposta contrátil à fenilefrina em anéis isolados de aorta.

Ao avaliarmos a participação da aldosterona na resposta contrátil à fenilefrina, dependente do HSM, observamos que o bloqueio crônico dos receptores de para MR, por meio do tratamento com espironolactona, induziu menor resposta contrátil no grupo OQT em relação ao grupo SHAM (Rmáx: SHAM SPI = 120,4 \pm 7,56 vs OQT SPI = 93,28 \pm 10,18, * $p < 0,05$) (Figura 16A). Para avaliar a participação da via do NO, incubamos os segmentos de aorta com um inibidor da NOS, L-NAME (100 μ M), como esperado, os anéis de aorta de ambos os grupos, apresentaram maior contração (Figura 16C e D) (Rmáx: SHAM SPI = 120,4 \pm 7,56 vs SHAM SPI LN= 154,7 \pm 6,654; OQT SPI = 93,28 \pm 10,18 vs OQT SPI LN = 158,6 \pm 10,79, * $p < 0,05$). Entretanto, o tratamento crônico com espironolactona e a incubação com L-NAME, não modificou a Rmax à fenilefrina entre os grupos OQT e SHAM (Rmáx: SHAM SPI LN= 154,7 \pm 6,654; OQT SPI LN = 158,6 \pm 10,79, * $p < 0,05$) (Figura 16B). Estes resultados sugerem que, tanto aldosterona quanto testosterona, são importantes para reduzir a biodisponibilidade de NO endotelial; aparentemente esses dois hormônios co-regulam a biodisponibilidade de NO endotelial, na retirada de um hormônio, o outro mantém a redução da contração, entretanto, quando ambos estão ausentes, eles deixam de reduzir a biodisponibilidade de NO.

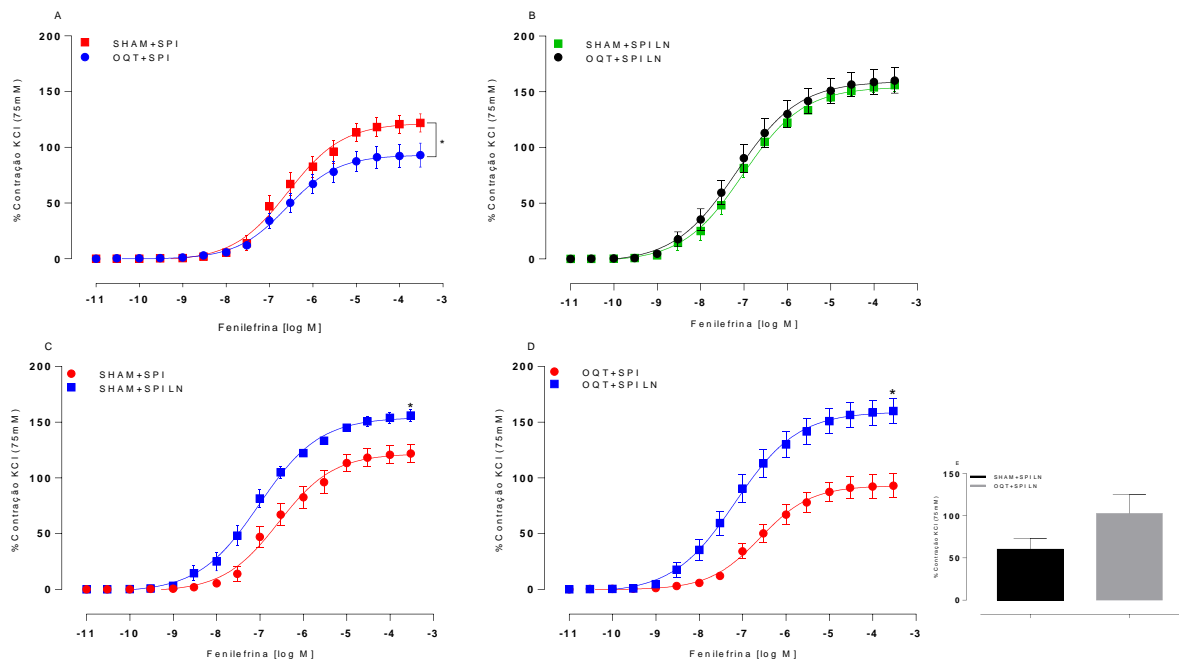


Figura 16 - Curva concentração-resposta à fenilefrina em animais tratados cronicamente com espironolactona e incubados com L-NAME; valores apresentados como média \pm SEM; n=número de animais * $p < 0,05$ test *t Student*.

Avaliamos a participação da aldosterona e dos HSM, na curva de concentração-resposta à fenilefrina. Os resultados indicam uma menor resposta contrátil do grupo OQT, tratado com espironolactona (Figura 17A) (R_{max} SHAM = $109,4 \pm 9,564$; SHAM+SPI = $120,4 \pm 7,56$; OQT = $109,3 \pm 11,14$; OQT+SPI = $93,28 \pm 10,18$, * $p < 0,05$). Investigamos a participação do endotélio vascular, sobre a reatividade dos anéis desses grupos. Como esperado, os anéis sem endotélio apresentaram aumento semelhante da reatividade (Figura 17B) (R_{max} : SHAM+SPI E- = $164,3 \pm 10,88$ vs OQT+SPI E- = $168,4 \pm 12,46$, * $p < 0,05$). Notamos então, avaliando o conjunto dos resultados, que as diferenças, antes existentes entre os grupos SHAM e OQT, desapareceram, tanto na presença de L-NAME quanto na ausência do endotélio vascular. Estes resultados demonstram uma menor participação do endotélio e da via do NO, sobre a resposta à fenilefrina no grupo OQT+SPI, o que sugere que a menor resposta contrátil à fenilefrina, após o bloqueio dos receptores de aldosterona, depende da biodisponibilidade de NO endotelial.

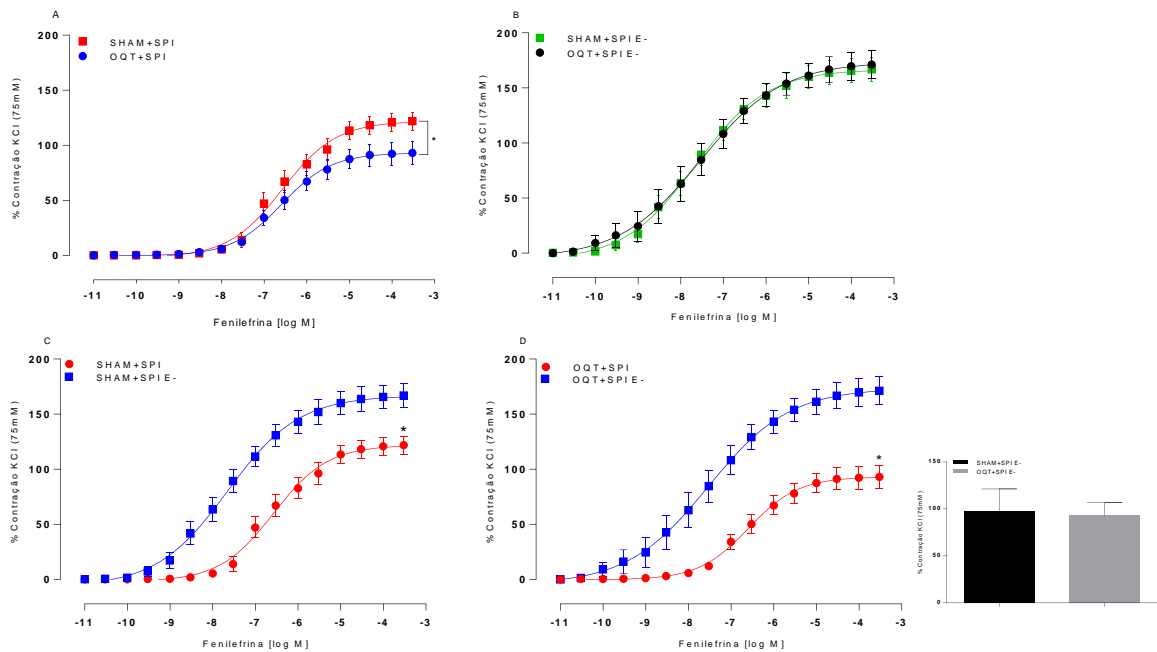


Figura 17- Curva concentração-resposta à fenilefrina em animais tratados cronicamente com espironolactona e anéis sem endotélio; valores apresentados como média \pm SEM; n=número de animais * $p < 0,05$ test *t Student*.

Para entender a participação da via da COX sobre a resposta contrátil vascular mediada pelo MR, bloqueamos, *in vitro*, a via da COX usando indometacina. Os resultados mostraram, uma redução de RMax, na presença de indometacina no grupo OQT+SPI (Figura 18B). Este resultado sugere a participação da aldosterona na via de ativação da COX, possivelmente de um vasoconstrictor, já que no grupo SHAM+SPI, a indometacina reduziu a contração (Rmax: SHAM+SPI = $120,4 \pm 7,56$; OQT+SPI = $93,28 \pm 10,18$; SHAM+SPI+INDO = $89,99 \pm 8,45$; OQT+SPI+INDO = $74,15 \pm 7,92$, * $p < 0,05$).

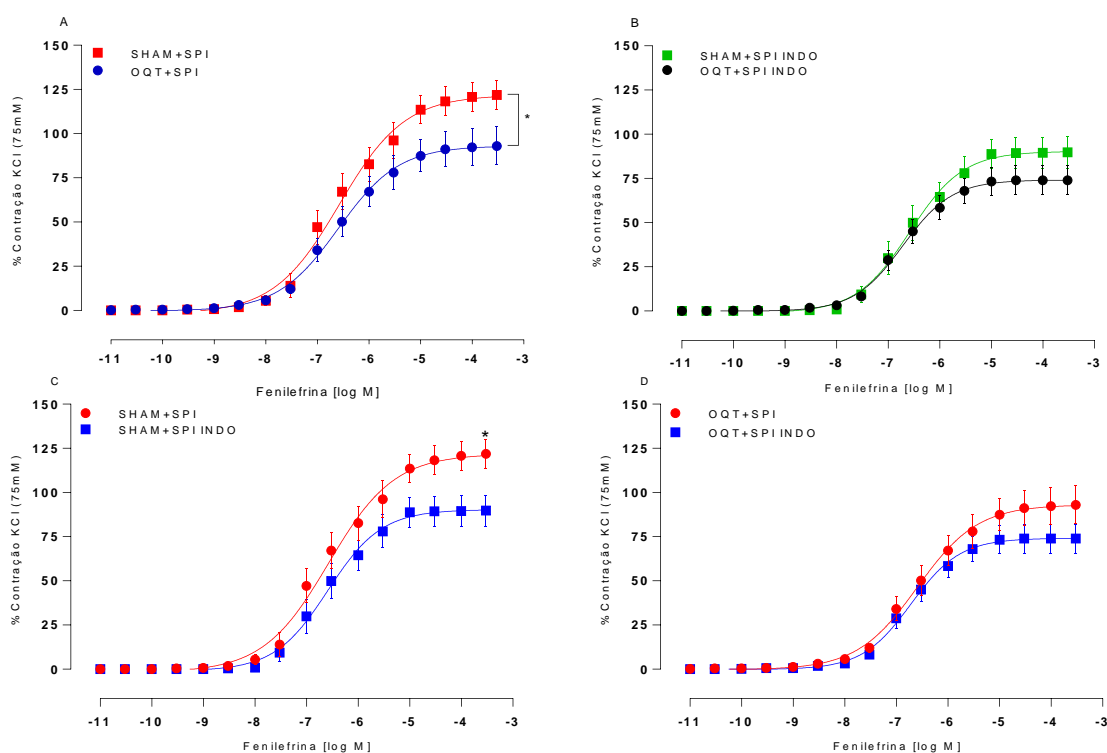


Figura 18- Curva concentração-resposta à fenilefrina em animais tratados cronicamente com espironolactona e anéis incubados com indometacina; valores apresentados como média \pm SEM; n=número de animais * $p < 0,05$ test *t* Student.

Efeitos do bloqueio de receptores de angiotensina II (Angio II) – AT1 pela administração de losartan.

A produção de NO endotelial parece ter sido modificada no grupo tratado com losartan, sobretudo no grupo OQT+LOS LN, sugerindo a importância da via da testosterona na produção de NO mediada pelos receptores de angiotensina. Estes dados sugerem que a testosterona participa da produção de NO mediada pela angio II, pois quando retiramos a produção de NO através do LN no grupo castrado há uma redução da $R_{m\acute{a}x}$ em relação ao seu controle (Figura 19B), sugerindo a importância da testosterona na resposta contrátil mediada pelo receptor de angiotensina AT1 ($R_{m\acute{a}x}$: SHAM+LOS = $127,5 \pm 5,63$; OQT+LOS = $135,6 \pm 4,74$; SHAM+LOS LN = $183,4 \pm 10,50$; OQT+LOS LN = $151,8 \pm 8,311$; * $p < 0,05$). A testosterona mostra-se importante para a ação da angiotensina em modular a produção de NO nos segmentos de aorta.

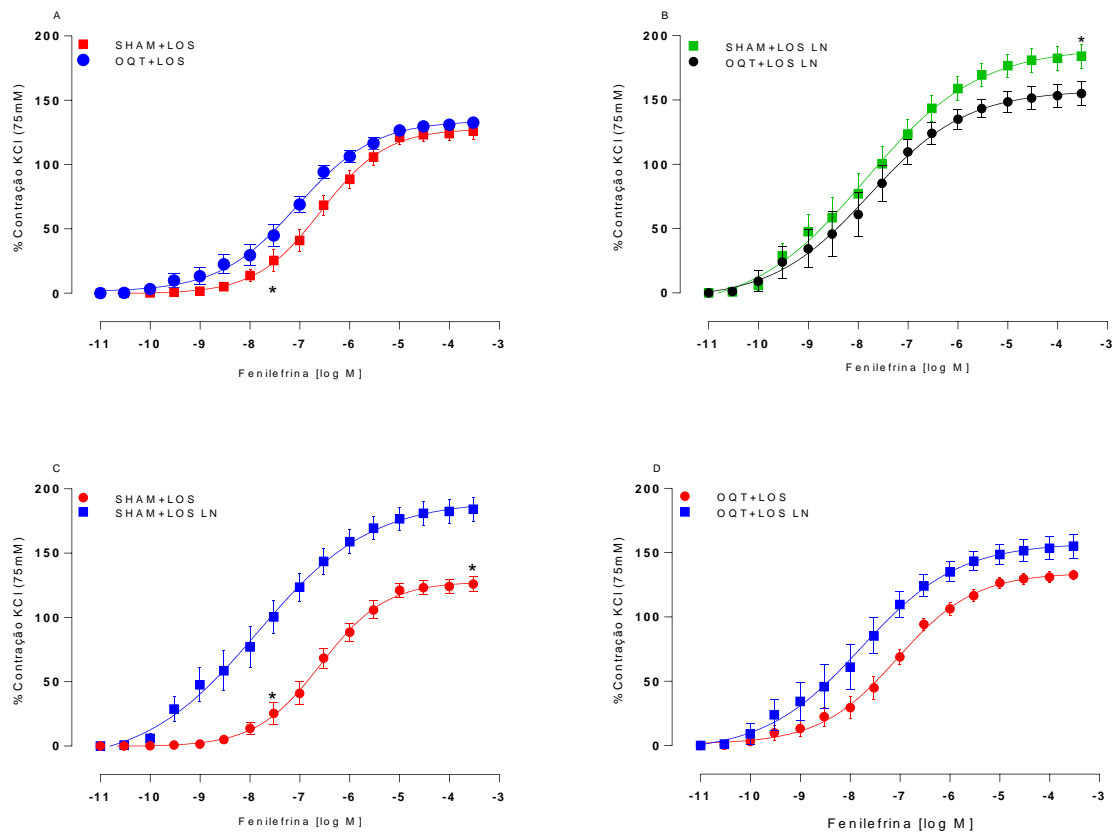


Figura 19- Curva concentração-resposta à fenilefrina em animais tratados durante 12 semanas com losartan em anéis isolados de aorta incubados com L-NAME; valores apresentados como média \pm SEM; n=número de animais * $p < 0,05$ *test t Student*.

Os efeitos do tratamento com inibidor da angiotensina II, losartan, em anéis sem endotélio, mostraram que a lesão do endotélio provocou o aumento da resposta à fenilefrina no grupo SHAM (Figura 20C), ou seja, animais com bloqueio dos receptores AT1 para angio II; entretanto não houve diferença estatística entre os grupos OQT+LOS E- e OQT+LOS CT (Figura 20D), sugerindo que a orquidectomia modificou a capacidade do músculo liso contrair quando o receptor de angiotensina foi bloqueado; sugerindo que ao bloquear o SRAA existe uma modulação positiva vasoconstrictora que depende da presença de angiotensina II. Os resultados mostraram os grupos, castrado e não castrado apresentaram um aumento da R_{máx}, mas dentre estes, o grupo OQT+LOS E- apresentou menor contração em relação ao grupo SHAM+LOS E- (Figura 20B). Esta diferença entre o grupo SHAM+LOS E- e OQT+LOS E-, indicando a castração tem ação sobre a via endotelial levando à prejuízo da contração quando retirado o endotélio (Figura 20B) (R_{máx}: SHAM+LOS =

127,5 ± 5,63; OQT+LOS = 135,6 ± 4,74; SHAM+LOS E- = 217,3 ± 26,77; OQT+LOS E- = 145,3 ± 7,90. * $p < 0,05$). Estes dados indicam a importância da via da testosterona para a função endotelial mediada pelos receptores de angiotensina e que esta participa da ação do endotélio; portanto a testosterona é importante para a ação da angiotensina em modular a função endotelial no vaso.

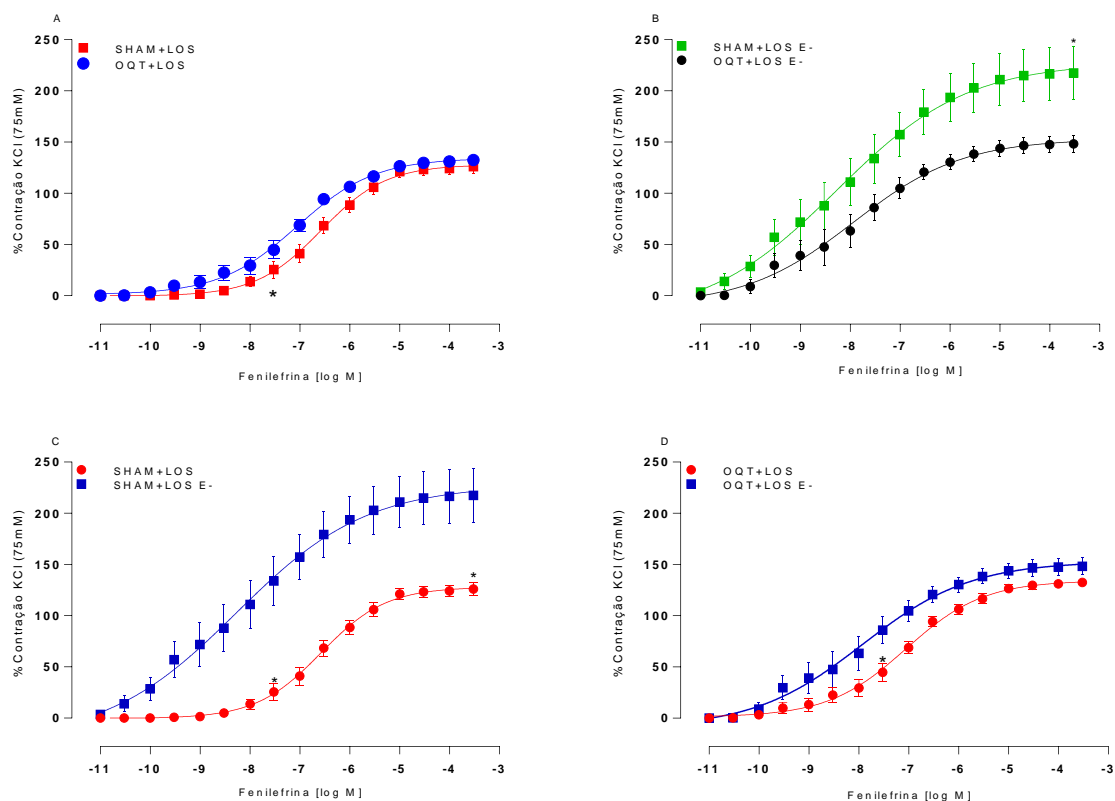


Figura 20- Curva concentração-resposta à fenilefrina em animais tratados por 12 semanas com losartan e anéis isolados de aorta sem endotélio; valores apresentados como média ± SEM; n=número de animais * $p < 0,05$ test *t Student*.

Ao bloquearmos a via da ciclooxigenase em anéis isolados de aorta de animais tratados com losartan por 12 semanas, verificamos que não houve diferença entre os grupos com a castração ou na presença da testosterona (Figura 21B) ($R_{\text{máx}}$: SHAM+LOS = 127,5 ± 5,63; OQT+LOS = 135,6 ± 4,74; SHAM+LOS INDO = 95,78 ± 7,780; OQT+LOS INDO = 108,2 ± 5,818. * $p < 0,05$). A angiotensina II estimula o aumento da síntese da COX 1/2, portanto ao inibir o receptor de angiotensina II, há também a inibição da via da cox, por isso a indometacina não relaxou o vaso, nos grupos (SHAM e OQT). Estes dados sugerem, portanto, que a testosterona não altera

a reatividade frente à inibição da angiotensina e da via da cox, ou seja, a testosterona não modifica a capacidade da angiotensina modular a via da cox na resposta vasoconstrictora à fenilefrina.

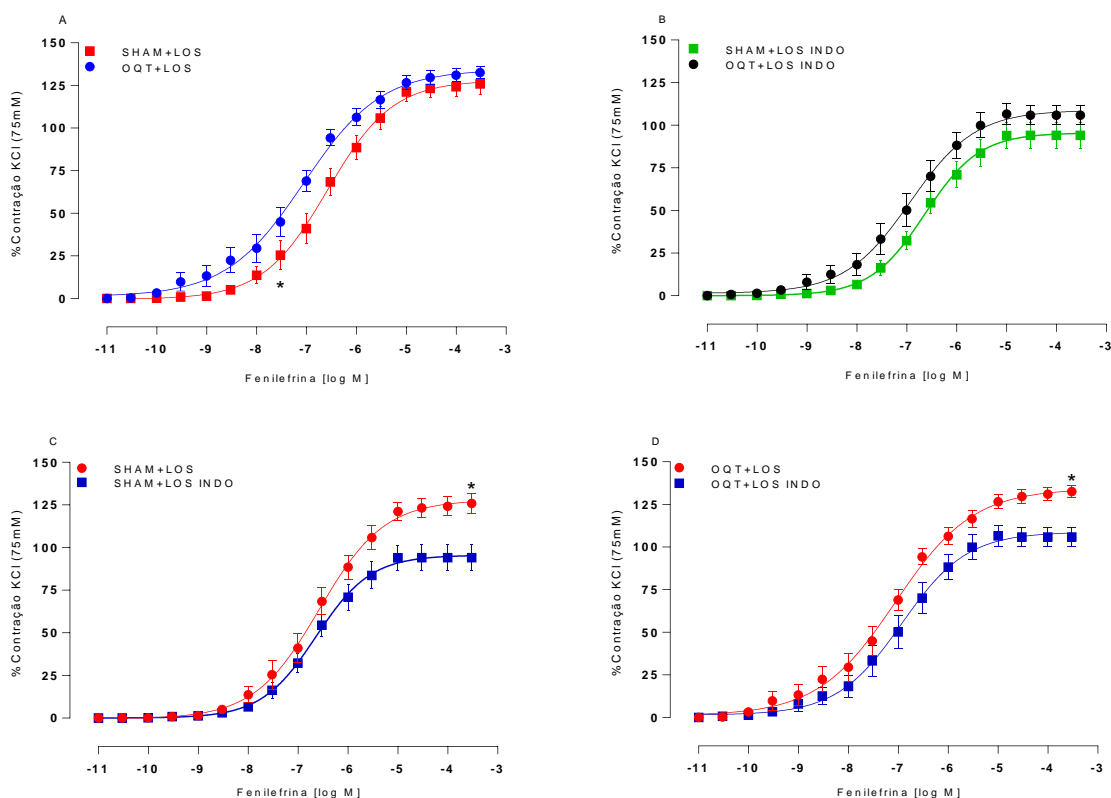


Figura 21 - Curva concentração-resposta à fenilefrina em animais tratados por 12 semanas com losartan em anéis isolados de aorta incubados com indometacina. Valores apresentados como média \pm SEM; n=número de animais * $p < 0,05$ test *t* Student. A potência foi maior no grupo OQT+LOS comparado com o grupo SHAM+LOS (A) * $p < 0,05$. Esta diferença desapareceu na presença de inibição da COX, com indometacina (B).

Ao bloquear a NOX com apocinina, não houve diferença nas respostas de $R_{m\acute{a}x}$ para os grupos SHAM e OQT (figura 22A e B) ($R_{m\acute{a}x}$: SHAM+APO = $126,9 \pm 9,837$; OQT+APO = $118,6 \pm 11,71$; SHAM+APO LN = $175,3 \pm 12,11$; OQT+APO LN = $151,8 \pm 5,89$) deste bloqueio em nenhum dos grupos e a retirada do endotélio não modificou esta condição (figura 23). A figura 22C e D, mostra que, o L-NAME foi capaz de aumentar a reatividade de ambos os grupos tratados com apocinina. A participação do endotélio vascular foi avaliada nos grupos SHAM e OQT tratados com apocinina (Figura 23). A retirada do endotélio provocou a mesma elevação da reatividade

vascular nos grupos SHAM e OQT (Rmáx: SHAM+APO = 126,9 ± 9,837; OQT+APO = 118,6 ± 11,71; SHAM+APO E- = 174,6 ± 12,32; OQT+APO E- = 197,2 ± 24,17).

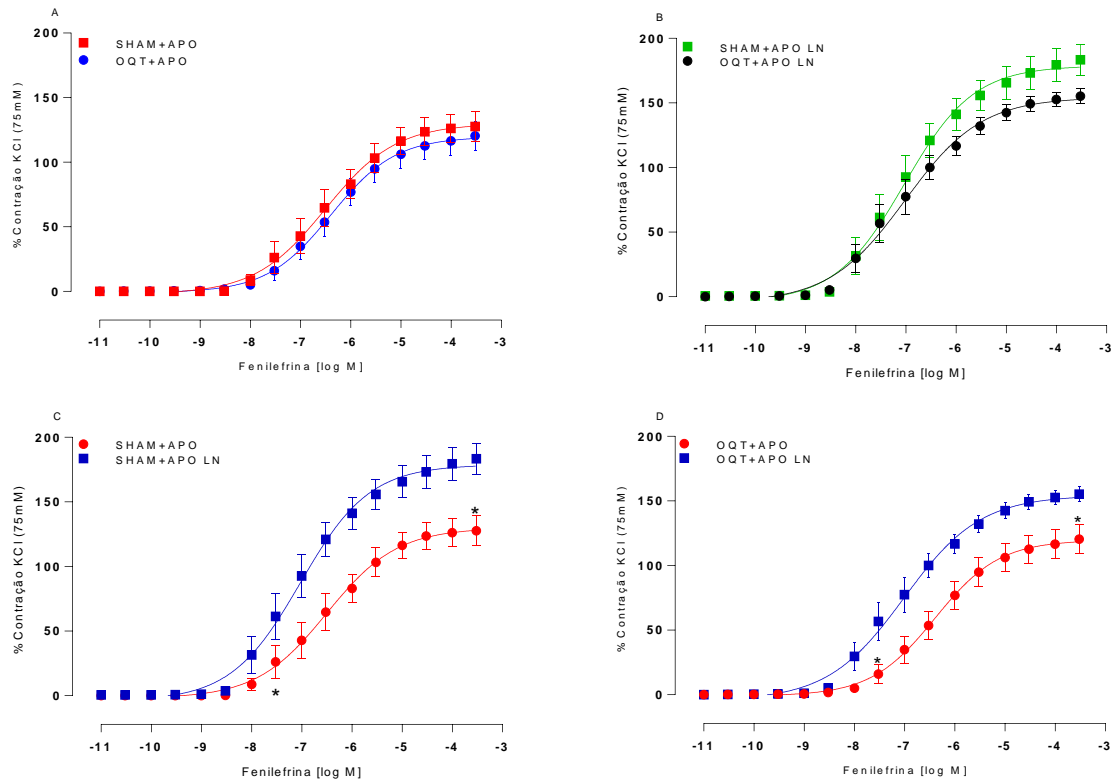


Figura 22 - Curva concentração-resposta à fenilefrina em animais tratados por 12 semanas com apocinina e anéis isolados de aorta incubados com L-NAME. Valores apresentados como média ± SEM; n=número de animais * $p < 0,05$ test *t* Student.

Ao bloquear a NOX com apocinina, os resultados mostraram não haver uma modulação deste bloqueio em nenhum dos grupos e a retirada do endotélio não modificou esta condição (Figura 23).

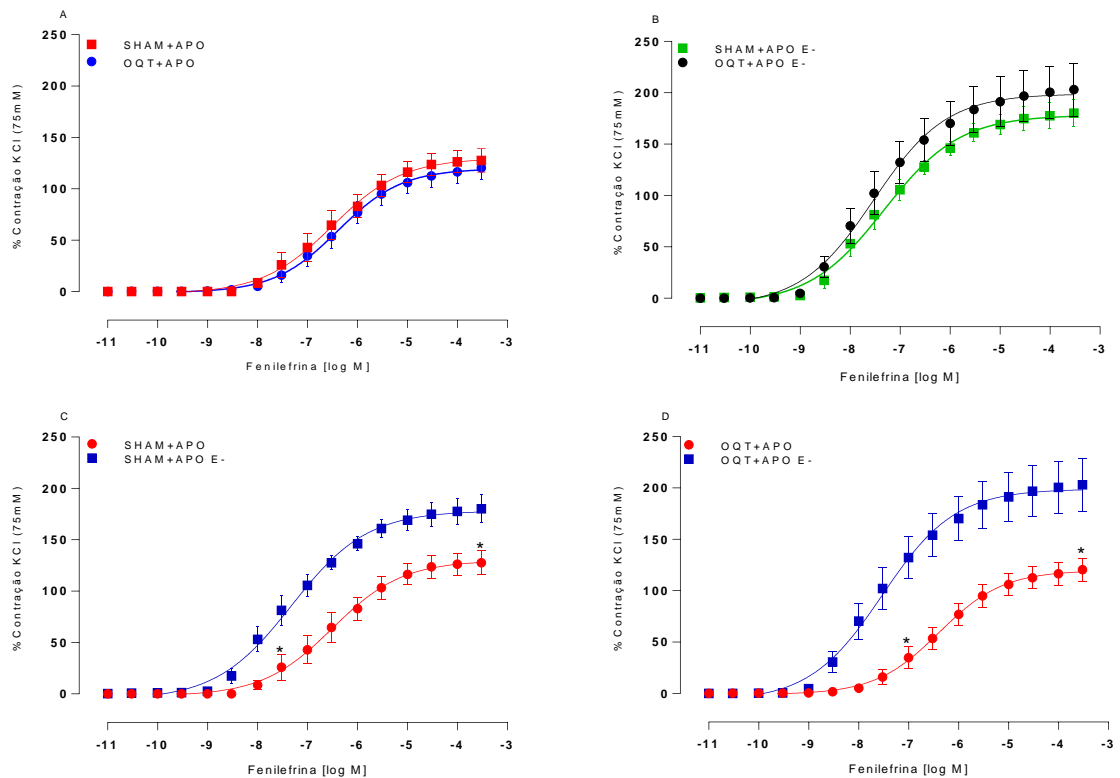


Figura 23- Curva concentração-resposta à fenilefrina em animais tratados por 12 semanas com apocinina em anéis isolados de aorta sem endotélio. Valores apresentados como média \pm SEM; n=número de animais * $p < 0,05$ test *t* Student.

O bloqueio com apocinina não teve modulação nos grupos SHAM e OQT e não houve diferença entre castrados e não castrados na via da COX, apresentando redução de contração igual aos controles em ambos os grupos, indicando uma aparente não modulação da testosterona sobre a resposta das vias da COX e NOX (Figura 24) (Rmáx: SHAM+APO = $126,9 \pm 9,837$; OQT+APO = $118,6 \pm 11,71$; SHAM+APO INDO = $90,66 \pm 7,55$; OQT+APO INDO = $82,53 \pm 11,24$).

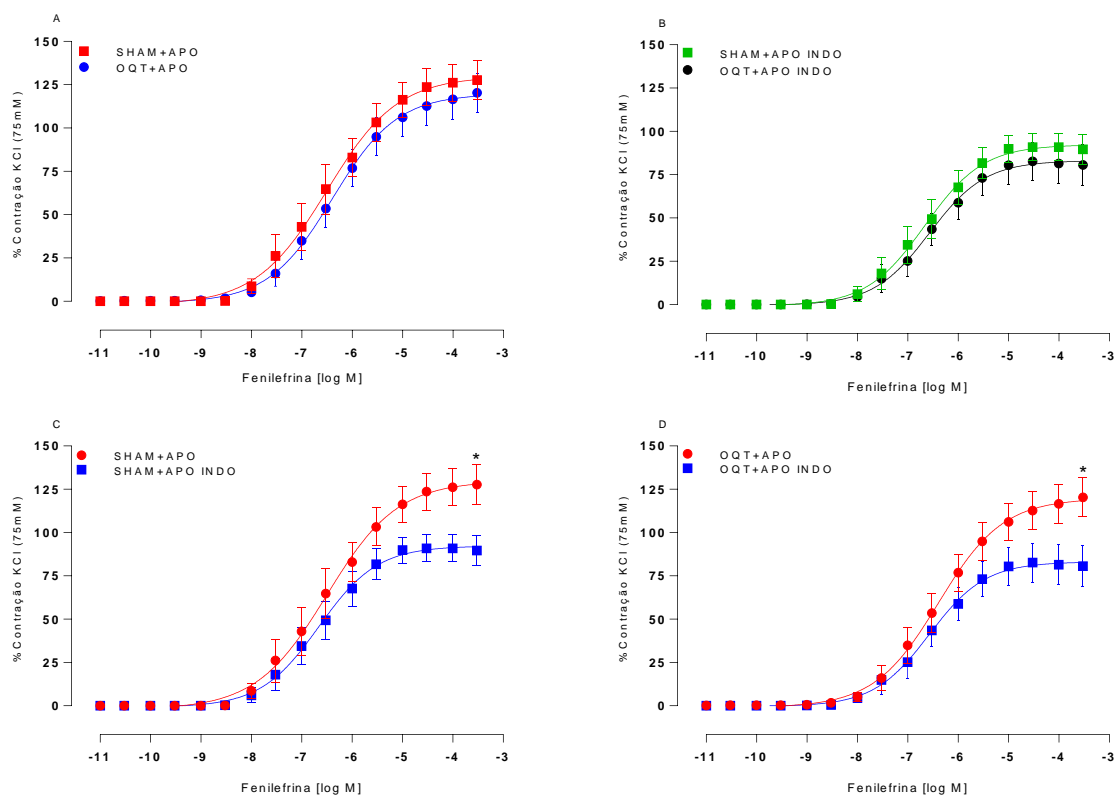


Figura 24- Curva concentração-resposta à fenilefrina em animais tratados por 12 semanas com apocinina em anéis isolados de aorta incubados com indometacina. Valores apresentados como média \pm SEM; n=número de animais * $p < 0,05$ test *t Student*.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos a regulação, de longo prazo, da testosterona e a inter-relação com o SRAA sobre a reatividade vascular em anéis de aorta de ratos jovens. Evidências crescentes têm mostrado que as ações vasculares dos hormônios sexuais masculinos e femininos contribuem para a regulação da pressão arterial. Entre os mecanismos envolvidos, tem-se evidenciado a interação entre os hormônios sexuais e o SRAA. A testosterona e outros andrógenos, têm efeito protetor sobre o sistema cardiovascular e podem desempenhar um papel importante na regulação da função vascular agindo por mecanismos genômicos e não genômicos (TOSTES et al., 2016). Agudamente, está bem descrita a ação não genômica vasodilatadora dependente do endotélio (JONES, T H, KELLY, 2018; KELLY; JONES, 2013). Entretanto, ainda não

está clara, a ação em longo prazo da testosterona, sobre a regulação do tônus vascular. No presente estudo, ratos jovens com 2 meses de idade, sofreram a cirurgia de orquidectomia, e após 12 semanas a reatividade vascular foi avaliada em anéis isolados da aorta.

Os principais achados do estudo funcional indicam que a reatividade a fenilefrina não foi diferente entre os grupos SHAM e OQT; não há alteração da reatividade no grupo castrado, porém em resposta aos tratamentos apresentaram as diferenças a seguir.

A retirada do endotélio vascular e a superfusão com L-NAME, elevaram a reatividade dos anéis de aorta, de maneira semelhante entre os grupos não tratados. Os tratamentos por 12 semanas com losartam e apocinina, não modificaram a R_{max} a fenilefrina, mas o tratamento com losartan, reduziu a participação do endotélio vascular no grupo OQT. O tratamento dos animais orquidectomizados com espironolactona, determinou uma menor reatividade vascular a fenilefrina, o que sugere que testosterona e aldosterona, conjuntamente, regulam positivamente a reatividade vascular, possivelmente por diminuírem a biodisponibilidade de NO e estimular um prostanóide vasoconstrictor. (Ver figura 14B e D, e graphic abstract e tabela 2)

Nosso objetivo, ao tratar os animais com apocinina, por 12 semanas, foi avaliar a via da NOX na ação vascular, de longo prazo, da testosterona sobre a reatividade vascular. A NOX é a principal fonte de ERO no sistema cardiovascular. Estudos tem mostrado que a atividade da NOX e sua expressão podem ser reguladas pela angiotensina II (GRIENGLING et al., 1994; PANDAY et al., 2015; RABÊLO et al., 2010; TOSTES et al., 2016). Em estudo com SHR, o tratamento crônico com apocinina reduziu a pressão arterial e preveniu a disfunção endotelial, associado a redução de geração de ERO e ao aumento da biodisponibilidade de NO (GRATON, 2017). Outros dados também mostraram que o tratamento com apocinina, também reduziu o efeito pressor da angiotensina II em SHR (GRATON, 2017). Nossa hipótese foi que a testosterona poderia participar da reatividade vascular, em longo prazo, por uma via dependente da angiotensina II e da ativação da NOX. Os animais orquidectomizados tratados com apocinina por 12 semanas, não apresentaram diferença de reatividade vascular em relação ao grupo OQT sem tratamento. Assim, a deficiência crônica dos hormônios sexuais masculinos, parece não ter modificado a resposta vascular dependente da NOX.

Nossa próxima pergunta foi direcionada para entender a participação da angiotensina II sobre a reatividade vascular, de longo prazo, da testosterona. Nessa etapa, tratamos animais orquidectomizados, por 12 semanas, com Losartan 15 mg/kg/dia. Não encontramos diferença da resposta máxima a fenilefrina entre os animais OQT e SHAM. Entretanto, a inibição dos receptores para angiotensina II, aumentou a potência a fenilefrina nos animais orquidectomizados, mas não no grupo SHAM, sem apresentar modificação da eficácia. Alterações de potência a fenilefrina, mediadas pelo bloqueio do receptor AT1, poderiam ser dependentes de mudanças de sinalização tanto endotelial quanto no musculo liso vascular.

Para entender se a via da COX estaria envolvida na mudança de potência a fenilefrina, no grupo OQT tratado com losartan, os anéis de aorta foram incubados com indometacina. A potência foi maior no grupo OQT+LOS comparado com o grupo SHAM+LOS. Esta diferença desapareceu na presença de inibição da COX com indometacina. Este resultado sugere então, que um possível mecanismo envolvido na maior potência, poderia ser dependente da via da COX. A sinalização da angiotensina II, mediada por receptor AT1, nas células do músculo liso vascular envolve a interação com proteínas G acopladas a segundos mensageiros, incluindo a fosfolipase A2 (PLA2) (TOUYZ; SCHIFFRIN, 2000). A estimulação da PLA2 promove a liberação de ácido araquidônico (AA) dos fosfolipídios de membrana, (BONVENTRE, 1992; RAO et al., 1994) que é processado pelas COX.

Em células mesangiais de ratos, a angiotensina II ativa a sinalização de Akt (serina-treonina quinase) na geração de AA e ROS (GORIN et al., 2001). A ativação de Akt mediada por angiotensina II, nas células do músculo liso vascular, é dependente da fosfoinositol 3-quinase (PI3-K), que se liga diretamente à região dominante de Akt e aumenta a atividade de Akt (DOWNWARD, 1998; WILDROUDT; FREEMAN, 2006). O próximo passo foi conhecer a participação do endotélio vascular e da via da NOS na reatividade mediada pela testosterona e modulada pela angiotensina II. À figura 19 estão demonstrados os resultados da reatividade dos anéis superfundidos com L-NAME e na figura 20 durante a retirada do endotélio vascular. Podemos verificar que, tanto na presença de L-NAME, quanto na ausência do endotélio vascular, a reatividade dos anéis do grupo OQT tratado com losartan foi menor do que o do seu controle (SHAM+LOS). Estes resultados sugerem uma menor participação do endotélio vascular e possivelmente, menor biodisponibilidade de NO nos grupos

OQT+LOS. Podemos concluir então, que o bloqueio crônico dos receptores para angiotensina II, modificou a reatividade dos anéis de aorta do grupo orquidectomizado. Estes dados sugerem que a testosterona modula a reatividade vascular, via endotélio, por uma via dependente da angiotensina II sobre a biodisponibilidade de NO.

A reatividade vascular foi avaliada frente a concentrações crescentes de fenilefrina, um agonista de receptores do tipo alfa adrenérgico. Usamos a fenilefrina para induzir a contração dos anéis, pois, sob condições fisiológicas, o sistema adrenérgico desempenha um papel crítico na regulação da função vascular. Os receptores adrenérgicos são membros da superfamília de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e modulam várias vias através de efetores como AC (adenilato ciclase) ou fosfolipase C (PLC). Os receptores alfa adrenérgicos são classificados em receptores alfa-1-adrenérgicos (α 1-ARs) e receptores alfa-2-adrenérgicos (α 2-ARs). Além disso, cada um desses grupos foi ainda sub-classificado em vários subtipos definidos pelas diferenças em suas sequências genéticas e sua ação farmacológica: α 1A, α 1B, α 1D, α 2A, α 2B, α 2C (CARBAJAL-GARCÍA; REYES-GARCÍA; MONTAÑO, 2020).

Os três subtipos de α 1-ARs estão presentes na maioria dos vasos sanguíneos modulando a contração do músculo liso e o tônus vascular. Entretanto, α 1A é o subtipo mais prevalente. Sabe-se que a manutenção do tônus vascular se deve ao equilíbrio entre vasoconstrição e vasorelaxamento modulado por diversos neurotransmissores e hormônios. Nós avaliamos a reatividade dos anéis de aorta, frente a estímulo pela fenilefrina, agonista α 1adrenérgico. A ativação desses receptores, no músculo liso vascular, envolve vias intracelulares, que ativam a contração, dependente do aumento de cálcio intracelular. Esses receptores ativam a enzima PLC e a via de sinalização IP₃, induzindo a liberação de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático (SR) e o influxo desse íon, desencadeia a resposta contrátil vascular. Os receptores do tipo α 1 são acoplados a uma proteína Gq heterotrimérica e pela via de sinalização PLC. O PLC desencadeia a formação de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG), resultando no aumento da concentração intracelular de Ca²⁺ e na ativação da proteína quinase C (PKC). Além disso, a estimulação de α 1-ARs promove um influxo de Ca²⁺ extracelular através de canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem e desencadeia quinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2 (ERK1/2) (CARBAJAL-GARCÍA; REYES-GARCÍA; MONTAÑO, 2020). Nossos resultados evidenciaram um aumento da potência da resposta dos α 1-ARs, nos animais orquidectomizados tratados com

losartan. Este dado sugere, a participação da angiotensina II, dependente da presença de testosterona, na regulação da resposta α_1 . As vias intracelulares envolvidas na mudança de potência, ainda precisam ser melhor exploradas. Entretanto, considerando que a inibição da via da COX, com indometacina, foi capaz de abolir esse aumento de potência, podemos sugerir o envolvimento de produtos da COX nesta resposta. Para confirmar essa hipótese, outros experimentos deverão ser feitos, para medir a expressão dessa enzima e a produção de prostanóides vasoativos.

Nosso próximo passo foi tentar entender a participação da aldosterona na resposta vascular dependente da testosterona. Para responder a esta pergunta, tratamos ratos orquidectomizados, com espironolactona por 12 semanas. O tratamento dos animais orquidectomizados com espironolactona, determinou uma menor reatividade vascular a fenilefrina, o que sugere que testosterona e aldosterona, conjuntamente, regulam positivamente a reatividade vascular. Para entender a participação do endotélio vascular nessa resposta, os anéis da aorta do grupo OQT+SPI foram removidos. A remoção do endotélio vascular, aboliu essa diferença de reatividade, sugerindo que o fator causador da menor reatividade vascular dependesse de algum fator de relaxamento endotelial. Assim, o próximo passo foi inibir a enzima NOS usando L-NAME no banho. A superfusão dos anéis isolados de aorta com L-NAME, elevou a reatividade vascular de maneira idêntica entre os grupos OQT e OQT+SPI. Esse resultado nos sugere que o possível fator responsável pela redução de R_{max} do grupo OQT+SPI, poderia ser o NO. Possivelmente, a ausência concomitante dos hormônios sexuais masculinos, em especial testosterona, e da aldosterona, podem ter causado um aumento da biodisponibilidade de NO. Estes resultados nos sugerem a existência de uma co-regulação da testosterona e da aldosterona, em condições fisiológicas, inibindo a NOS endotelial na aorta. A retirada de apenas um desses hormônios, seria contrabalanceada pelo outro, de forma que a reatividade vascular seria mantida inalterada. Entretanto, quando ambos os hormônios estão ausentes, o endotélio teria uma maior biodisponibilidade de NO, causando uma redução da resposta contrátil a fenilefrina. A possibilidade de que a ação desses hormônios possa depender da biodisponibilidade de NO endotelial baseia-se no fato de que, a retirada do endotélio vascular, assim como a superfusão com L-NAME, aboliu a redução de reatividade vascular no grupo OQT+SPI (figuras 16 e 17). Para reforçar essa hipótese, será

preciso medir também a biodisponibilidade de NO e a expressão da NOS nesses grupos.

Avaliamos também a possibilidade da participação dos prostanóides vasoconstrictores serem modulados pela testosterona e pela aldosterona para co-regularem a reatividade vascular. Para tanto, superfundimos os anéis de aorta dos animais OQT tratados com espironolactona, usando indometacina, um bloqueador inespecífico da COX. Na figura 18 podemos confirmar nossa hipótese. Na presença de indometacina, a reatividade dos anéis de aorta do grupo OQT+SPI foi igual ao grupo SHAM+SPI. Este resultado nos sugere que a menor reatividade do grupo OQT+SPI dependia da via da COX. Nossa interpretação do conjunto desses resultados é que a testosterona e a aldosterona, colaboram na regulação da reatividade vascular, por uma via que depende da ativação de prostanóides vasoconstrictores ou da inibição de prostanóides vasodilatadores. Ou seja, na ausência concomitante da testosterona e da aldosterona, a reatividade foi menor quando a COX estava presente. Quando a COX foi inibida com indometacina, no grupo OQT+SPI, a reatividade voltou ao valor do grupo SHAM. Para esclarecer qual dessas vias está sendo influenciada, novos experimentos deverão ser realizados para medir a expressão das proteínas da via constrictora (PGE) e dilatadora (PGI) assim como seus metabólitos estáveis. A via do TXA₂ também poderá nos dar informação do mecanismo pelo qual esses hormônios estão agindo na regulação da reatividade vascular.

Estudos anteriores (MISHRA; HANKINS; KUMAR, 2016) já demonstraram que a retirada da testosterona promove aumento da expressão de receptores de angiotensina do tipo II (AT₂) que tem efeito vasodilatador. Os autores descreveram uma diferença entre machos e fêmeas. A castração dos ratos elevou significativamente os níveis de RNA mensageiro e de proteínas de receptores de angiotensina tipo 2 (AT₂) (MISHRA; HANKINS; KUMAR, 2016). Nossos dados corroboraram este resultado de que os andrógenos participam da regulação da reatividade vascular. A orquidectomia, por si só não foi capaz de promover alterações na eficácia ou potência da fenilefrina. Entretanto, isoladamente, tanto a retirada dos hormônios sexuais masculinos ou o bloqueio dos receptores para aldosterona, não modificou a reatividade vascular dos anéis de aorta a fenilefrina. Porém, quando as duas vias hormonais foram retiradas concomitantemente, a reatividade vascular a

fenilefrina reduziu. A aldosterona inibe agudamente a liberação endotelial de NO, portanto há de se pensar que sua inibição poderia induzir esta liberação endotelial de NO (FELS; OBERLEITHNER; KUSCHE-VIHROG, 2010). Fels e colaboradores (2010) descreveram uma inibição aguda da eNOS dependente da aldosterona (FELS; OBERLEITHNER; KUSCHE-VIHROG, 2010). Esses autores demonstraram, que baixas concentrações de aldosterona podem estimular a liberação de NO em minutos. De fato, há um conjunto de evidências substanciais sugerindo que os hormônios sexuais interferem na síntese e biodisponibilidade do NO derivado do endotélio (ALVES et al., 2020; BIANCHI et al., 2006; COLLINS et al., 1994; LYRIO; RIBEIRO JR; STEFANON, 2014). Estudos em animais mostram que a liberação de NO endotelial é maior em ratas do que em ratos (HUANG et al., 1997; WELLMAN et al., 1996). De fato, o estradiol induz a expressão endotelial de óxido nítrico sintase (eNOS), mediada pelo receptor de estradiol alfa. Por outro lado, a testosterona também pode ter algum efeito sobre a produção de NO.

Já foi descrito em ensaios clínicos que a aldosterona prejudica a reatividade vascular (BLACHER et al., 1997; BROWN, 2005; QUASCHNING et al., 2001). Entretanto, os mecanismos envolvidos ainda não são completamente compreendidos. A aldosterona aumenta a produção de ROS nas células endoteliais e reduz a biodisponibilidade do NO (LEOPOLD et al., 2007). Conseqüentemente, há prejuízo da vasodilatação mediada pelo endotélio, que pode ser revertida com antagonistas da aldosterona. A redução da biodisponibilidade de NO pela aldosterona parece ser atribuível à diminuição da atividade da eNOS. Uma limitação no presente estudo, foi que não avaliamos a expressão da eNOS e nem medimos a produção de NO vascular para inferir a participação da aldosterona e testosterona. Esta etapa do trabalho foi iniciada, porém, por questões técnicas não conseguimos finalizar essas análises que já estão programadas para serem feitas em breve.

Nossa hipótese de coparticipação entre aldosterona e testosterona fundamenta-se nos achados do nosso estudo e no fato de que, o receptor de andrógeno, o receptor de glicocorticóide e receptor de mineralocorticóide são receptores nucleares que compartilham semelhanças estruturais e têm sítios de ligação ao DNA e co-reguladores intimamente relacionados (MORALES; MARTÍN-VASALLO; ÁVILA, 2022). Assim, um bom equilíbrio das atividades desses receptores é essencial para garantir a função celular correta.

Além disso, há evidências de que **receptor de mineralocorticóide** e o **receptor de glicocorticóide** compartilham o sítio de ligação ao DNA e co-reguladores, e que o **receptor de mineralocorticóide** pode ser um inibidor competitivo de **receptor de glicocorticóide** que regula a expressão de genes alvo de **receptor de andrógeno** quando este está inibido ou ausente (PLANEY et al., 2002; SHIOTA et al., 2018). O conjunto desses resultados sugerem a co-participação da testosterona, da angiotensina II e da aldosterona, na modulação de longo prazo, da contração vascular, induzida pela fenilefrina.

7 REFERÊNCIAS

ALVES, J. V. et al. Supraphysiological Levels of Testosterone Induce Vascular Dysfunction via Activation of the NLRP3 Inflammasome. **Frontiers in immunology**, v. 11, n. July, p. 1–14, 2020.

BIANCHI, P. R. et al. Myocardial infarction increases reactivity to phenylephrine in isolated aortic rings of ovariectomized rats. **Life Sciences**, v. 78, n. 8, p. 875–881, 18 jan. 2006.

BLACHER, J. et al. Association Between Increased Plasma Levels of Aldosterone and Decreased Systemic Arterial Compliance in Subjects With Essential Hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 10, n. 12, p. 1326–1334, 1997.

BONVENTRE, J. V. Phospholipase A2 and Signal Transduction. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 3, n. 2, p. 128–150, 1992.

BRINKMANN, A. O. Chapter 1 Molecular Mechanisms of Androgen Action – A Historical Perspective. **Androgen Action, Methods in Molecular Biology**, 2011.

BROWN, N. J. Aldosterone and end-organ damage. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 14, n. 3, p. 235–241, 2005.

CAHILL, P. A.; REDMOND, E. M. Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. **Atherosclerosis**, v. 248, p. 97–109, 1 maio 2016.

CARBAJAL-GARCÍA, A.; REYES-GARCÍA, J.; MONTAÑO, L. M. Androgen Effects on the Adrenergic System of the Vascular, Airway, and Cardiac Myocytes and Their

Relevance in Pathological Processes. **International Journal of Endocrinology**, v. 2020, p. 1–25, 12 nov. 2020.

CHISTIYAKOV, D. A. et al. Vascular Health and Risk Management Dovepress Role of androgens in cardiovascular pathology. **Vascular Health and Risk Management**, p. 14–283, 2018.

COLLINS, P. et al. Nitric Oxide Accounts for Dose-Dependent Estrogen-Mediated Coronary Relaxation After Acute Estrogen Withdrawal. **Circulation**, v. 90, p. 1964–1968, 1994.

CONVERSE, A.; THOMAS, P. Androgens promote vascular endothelial cell proliferation through activation of a ZIP9-dependent inhibitory G protein/PI3K-Akt/Erk/cyclin D1 pathway. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 538, p. 111461, dez. 2021.

DAVEL, A. P. et al. New roles of aldosterone and mineralocorticoid receptors in cardiovascular disease: translational and sex-specific effects. **REVIEW Integrative Cardiovascular Physiology and Pathophysiology Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 315, p. 989–999, 2018.

DOWNWARD, J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 10, p. 262–267, 1998.

FELS, J.; OBERLEITHNER, H.; KUSCHE-VIHRIG, K. Ménage à trois: Aldosterone, sodium and nitric oxide in vascular endothelium. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1802, n. 12, p. 1193–1202, 2010.

FÖRSTERMANN, U. Oxidative stress in vascular disease: Causes, defense mechanisms and potential therapies. **Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine**, v. 5, n. 6, p. 338–349, jun. 2008.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: Regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, abr. 2012.

GERMANO BARP, C.; BONAVENTURA, D.; ASSREUY, J. NO, ROS, RAS, and PVAT: More Than a Soup of Letters. **Front. Physiol**, v. 12, fev. 2021.

GORIN, Y. et al. Angiotensin II activates Akt/protein kinase B by an arachidonic acid/redox-dependent pathway and independent of phosphoinositide 3-kinase. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 11, p. 1909–1920, set. 2001.

GRATON, M. E. Efeitos do tratamento crônico com apocinina sobre a resposta vasoconstritora da angiotensina II em ratos espontaneamente hipertensos. **Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, 2017.

GRIENGLING, K. K. et al. Angiotensin II Stimulates NADH and NADPH Oxidase Activity in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells Key Words * NADH oxidase * NADPH oxidase vascular smooth muscle * angiotensin II * superoxide anion. **Circulation Research**, v. 74, n. 6, p. 1141–1148, 1994.

HÄGGSTRÖM, M.; RICHFIELD, D. Diagram of the pathways of human steroidogenesis. **WikiJournal of Medicine**, v. 1, n. 1, 2014.

HANDELSMAN, D. J. **Androgen Physiology, Pharmacology, Use and Misuse**.

HEMMENS, B.; MAYER, B. Enzymology of Nitric Oxide Synthases. **Methods in Molecular Biology**, v. 100, 1998.

HUANG, A. et al. Gender difference in myogenic tone of rat arterioles is due to estrogen-induced, enhanced release of NO. **Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)**, v. 272, p. 1804–1809, 1997.

JONES, T H, KELLY, D. M. Randomized controlled trials – mechanistic studies of testosterone and the cardiovascular system. **Asian Journal of Andrology**, v. 20, n. July, p. 1–4, 2018.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, P. **Histologia básica: texto e atlas**. 13. ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

KAKARLA, M. et al. Cardiovascular Effects of Androgen Deprivation Therapy in Prostate Cancer Patients: A Systematic Review. **Cureus**, 22 jun. 2022.

KATUSIĆ, Z. S. Role of nitric oxide signal transduction pathway in regulation of vascular tone. **International angiology: a journal of the International Union of Angiology**, v. 11, n. 1, p. 14–9, 1992.

KELLY, D. M.; JONES, T. H. Testosterone: a vascular hormone in health and disease. **Vasoreactivity Journal of Endocrinology**, v. 217, p. 47–71, 2013.

KIENITZ, T.; QUINKLER, M. **Testosterone and blood pressure regulation. Kidney and Blood Pressure Research**, abr. 2008.

KOUKOULIS, G. N. et al. Testosterone and dihydrotestosterone modulate the redox homeostasis of endothelium. **Cell Biology International**, v. 46, n. 4, p. 660–670, 30 abr. 2022.

LEOPOLD, J. A. et al. Aldosterone impairs vascular reactivity by decreasing glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **Nature Medicine**, v. 13, n. 2, p. 189–197, fev. 2007.

LINCOLN, T. M.; SELLAKE, H. Signal Transduction in Smooth Muscle Invited Review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. **Journal Applied Physiology**, v. 91, p. 1421–1430, 2001.

LI, Z. et al. Prostacyclin facilitates vascular smooth muscle cell phenotypic transformation via activating TP receptors when IP receptors are deficient. **Acta Physiologica**, v. 231, n. 2, 1 fev. 2021.

LORIGO, M. et al. Vascular Pathways of Testosterone : Clinical Implications. **Journal of Cardiovascular Translational Research**, 2019.

LU, Q. et al. Pkc̄mediates mineralocorticoid receptor activation by angiotensin II to modulate smooth muscle cell function. **Endocrinology**, v. 160, n. 9, p. 2101–2114, 2019.

LYRIO, R.; RIBEIRO JR, F.; STEFANON, I. Sex hormones in the cardiovascular system. **Horm Mol Biol Clin Invest**, v. 18, n. 2, p. 89–103, 2014.

MCCURLEY, A. et al. **Smooth muscle cell mineralocorticoid receptors: Role in vascular function and contribution to cardiovascular disease. Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, dez. 2013.

MENDONÇA, B. B. et al. Síndrome de Insensibilidade aos Andrógenos: Análise Clínica, Hormonal e Molecular de 33 Casos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 49, n. 1, p. 87–97, 2005.

MILLER, K. Kardiovaskuläre Risiken der Androgendeprivationstherapie beim Prostatakarzinom. **Urologe**, v. 55, n. 5, p. 627–631, 1 maio 2016.

MISHRA, J. S.; HANKINS, G. D.; KUMAR, S. Testosterone downregulates angiotensin II type-2 receptor via androgen receptor-mediated ERK1/2 MAP kinase pathway in rat aorta. **JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 17, n. 4, p. 1–9, 2016.

MONCADA, S. Nitric oxide. **Journal of hypertension. Supplement : official journal of the International Society of Hypertension**, v. 12, n. 10, p. S35-9, dez. 1994.

MORALES, M.; MARTÍN-VASALLO, P.; ÁVILA, J. Genetic Profiling of Glucocorticoid (NR3C1) and Mineralocorticoid (NR3C2) Receptor Polymorphisms before Starting Therapy with Androgen Receptor Inhibitors: A Study of a Patient Who Developed Toxic Myocarditis after Enzalutamide Treatment. **Biomedicines**, v. 10, n. 6, p. 1271, 29 maio 2022.

OLIVEIRA-FILHO, A. A. DE. **PARTICIPAÇÃO DA VIA DO ÓXIDO NÍTRICO E DO CÁLCIO NO VASORRELAXAMENTO INDUZIDO PELO FLAVONOIDE 5,7,4 '-TRIMETOXIFLAVONA (TMF) EM ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR DE RATO. Dissertação** João Pessoa - PB, 2012.

OWENS, G. K. Regulation of Differentiation of Vascular Smooth Muscle Cells. **Physiological Reviews**, v. 75, n. 3, 1995.

PANDAY, A. et al. REVIEW NADPH oxidases : an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 12, n. March 2014, p. 5–23, 2015.

PLANEY, S. L. et al. Inhibition of glucocorticoid-induced apoptosis in 697 pre-B lymphocytes by the mineralocorticoid receptor N-terminal domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 44, p. 42188–42196, 1 nov. 2002.

QUASCHNING, T. et al. Aldosterone Receptor Antagonism Normalizes Vascular Function in Licorice-Induced Hypertension. **Hypertension**, v. 37, p. 801–805, fev. 2001.

RABÊLO, L. A. et al. Desbalanço Redox: NADPH Oxidase como um Alvo Terapêutico no Manejo Cardiovascular Artigo de Revisão. **sOCIEDADE Brasileira de Cardiologia**, p. 684–693, 2010.

RAO, G. N. et al. Angiotensin II stimulates phosphorylation of high-molecular-mass cytosolic phospholipase A2 in vascular smooth-muscle cells. **Biochem. J**, v. 299, p. 197–201, 1994.

RESENDE, R. R.; GUATIMOSIN, S.; LEITE, M. DE F. **Sinalização de cálcio: Bioquímica e fisiologia celulares**. São Paulo: Sarvier, 2012.

RIBEIRO JR, R. F. et al. Testosterone deficiency prevents left ventricular contractility dysfunction after myocardial infarction. **Molecular and Cellular Endocrinology**, n. June, 2017.

ROBBINS, R. A.; GRISHAM, M. B. Nitric Oxide. **Int. J. Biochem. Cell Bid**, v. 29, n. 6, p. 857–860, 1997.

ROBERT A. KLONER, CULLEY CARSON III, ADRIAN DOBS, STEPHEN KOPECKY, E. R. M. I. Testosterone and Cardiovascular Disease. **JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY**, v. 67, n. 5, 2016.

RUBANYI, C. M. Endothelium-Derived Relaxing and Contracting Factors. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 46, p. 27–36, 1991.

RZUCIDLO, E. M.; MARTIN, K. A.; POWELL, R. J. Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. **Journal of Vascular Surgery**, v. 45, n. 6 SUPPL., p. A25–A32, 2007.

SAIGAL, C. S. et al. Androgen deprivation therapy increases cardiovascular morbidity in men with prostate cancer. **Cancer**, v. 110, n. 7, p. 1493–1500, 1 out. 2007.

SCHINI, V. B.; VANHOUTTE, P. M. Nitric oxide and homeostasis of the smooth vascular muscle. **Archives des maladies du coeur et des vaisseaux**, v. 86 Spec No 1, p. 83–9, jan. 1993.

SHIOTA, M. et al. Mineralocorticoid receptor signaling affects therapeutic effect of enzalutamide. **The Prostate**, v. 78, n. 14, p. 1045–1052, 1 out. 2018.

SIMÕES, R. P. **EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO CLORETO DE MERCÚRIO INDUZ DISFUNÇÃO ENDOTELIAL EM AORTA E ACELERA O DESENVOLVIMENTO DA HIPERTENSÃO EM SHR JOVENS.** , [s.d.].

SUKOCHEVA, O. A. Androgens and esophageal cancer: What do we know? **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 20, p. 6146–6156, 2015.

TEOH, J. Y. et al. Endothelial dysfunction after androgen deprivation therapy and the possible underlying mechanisms. **The Prostate**, v. 82, n. 1, p. 13–25, 27 jan. 2022.

TEOH, J. Y. C. et al. Risk of cardiovascular thrombotic events after surgical castration versus gonadotropin-releasing hormone agonists in Chinese men with prostate cancer. **Asian Journal of Andrology**, v. 17, n. 3, p. 493–496, 1 maio 2015.

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.

TOUYZ, R. M. et al. Vascular smooth muscle contraction in hypertension. **Cardiovascular Research**, v. 114, n. 4, p. 529–539, 15 mar. 2018.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 4, p. 639–72, dez. 2000.

VANE, J.; CORIN, R. E. Prostacyclin: A vascular mediator. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 26, n. 6, p. 571–578, 2003.

WELLMAN, G. C. et al. Gender Differences in Coronary Artery Diameter Involve Estrogen, Nitric Oxide, and Ca²⁺-Dependent K⁺ Channels. **Circulation Research**, v. 79, n. 5, p. 1024–1030, nov. 1996.

WILDROUDT, M. L.; FREEMAN, E. J. Regulation of Akt by arachidonic acid and phosphoinositide 3-kinase in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1761, n. 1, p. 11–16, jan. 2006.

WU, F. C. W. et al. Hypothalamic-Pituitary-Testicular Axis Disruptions in Older Men Are Differentially Linked to Age and Modifiable Risk Factors : The European Male Aging Study. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 93, n. July, p. 2737–2745, 2008.

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. April, p. 1822–1828, 2010.