

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

**WENDER DO NASCIMENTO ROUVER**

**EFEITOS CARDIOVASCULARES DO TRATAMENTO CRÔNICO  
COM TESTOSTERONA EM RATOS WISTAR.**

**VITÓRIA  
2014**

**WENDER DO NASCIMENTO ROUVER**

**EFEITOS CARDIOVASCULARES DO TRATAMENTO CRÔNICO  
COM TESTOSTERONA EM RATOS WISTAR.**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Margareth Ribeiro Moysés

**VITÓRIA  
2014**

**WENDER DO NASCIMENTO ROUVER**

**EFEITOS CARDIOVASCULARES DO TRATAMENTO CRÔNICO  
COM TESTOSTERONA EM RATOS WISTAR.**

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

Aprovada em dezembro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Margareth Ribeiro Moysés - Orientadora, UFES

---

Prof. Dr. Roger Lyrio dos Santos - Co-orientador, UFES

---

Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade, UVV

---

Prof. Dr. Jones Bernardes Graceli, UFES

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ivanita Stefanon- Coordenadora do PPGCF, UFES

**VITÓRIA**

**2014**

## **DEDICO ESTE TRABALHO**

As pessoas que acreditaram e confiaram a mim essa experiência, mas principalmente aos meus pais.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela graça de ter completado essa caminhada pelas veredas do conhecimento. Agradeço a todo povo brasileiro que, ao pagar seus impostos, possibilita que esse tipo de atividade aconteça. Espero que de algum modo essa pesquisa possa servir à sociedade um dia. Agradeço ao CNPq e ao PPGCF/UFES por custearam as despesas desse projeto. A todos que me ajudaram, de forma direta ou indireta, na conclusão deste trabalho. No entanto, não poderia deixar de citar alguns nomes que fizeram parte dessa realização junto comigo.

A toda minha família, que na pessoa de Dona Luzia (minha mãe) me deu todo apoio que uma mãe poderia dar a um filho. Agradeço aos meus irmãos Emerson e Anderson pelo suporte durante todo tempo. Meu muito obrigado também as minhas cunhadas Polyana Rouver e a Juliana Nunes por sempre estarem próximas, muitas vezes escutando meus lamentos, Também não poderia deixar de citar meu pai, José Carlos Rouver pela formação do meu caráter, o que me ajudou a ser o que sou hoje e ao padrasto Manoel Ribeiro pelos conselhos.

Também agradeço os amigos que estiveram ao meu lado, me ajudando com o máximo de empenho e dedicação. Agradecimentos a André Luiz, por der me doado em muitos momentos, seus ouvidos e por toda dedicação dispensada em ajudas de todos os tipos possíveis. Não poderia deixar de agradecer a todos da Comunidade Católica São João Batista de Barcelona, e todos que oraram a Deus por mim. Sem a ajuda de pessoas como vocês, provavelmente o peso desses anos seria muito maior do que foi. Meu muito obrigado e que Deus os abençoe.

Não poderia deixar de agradecer a todos os amigos de Laboratório de Reatividade Vascular Coronariana. Agradeço a Nathalie Tristão por ter sido um braço de apoio para todas as horas. Um companheirismo que se iniciou no primeiro dia de laboratório. Sei que boa parte desse trabalho tem a participação

dela. Também agradeço a Angelina Rafaela, que do segundo ano em diante se somou a Nathalie, me confiando sua amizade e companheirismo, não medindo esforços para ajudar no que fosse preciso. Saiba que aprendi muito com você! Muito obrigado! Agradeço ao apoio de cada um dos alunos da graduação: Belinha, Juliana Trindade, Cassiano, Pamella, Rafaela, Dálete, Marjory, Juliana Gomes, Jéssica, Jeisdens e Rogério. Muito obrigado!!

Agradeço também a todos os demais laboratórios vizinhos, em especial ao laboratório de Regulação Humoral da Circulação, onde não poderia deixar de agradecer em especial ao Erick Cláudio e Mariana. Nunca me esquecerei das ricas conversas que tivemos. Fabrício e Simone pelo companheirismo e pela prontidão em se colocar como próximos em momentos de alegria e tristezas. Vocês são grandes amigos! Agradeço também a cada um do laboratório de patologia, onde eu sempre encontrava uma palavra amiga, principalmente na reta final desse projeto.

De forma especial gostaria de agradecer aos professores orientadores Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Margareth Ribeiro Moysés e Prof Dr Roger Lyrio dos Santos. A professora Margareth, pela confiança e credibilidade dispensadas a mim. Agradeço pelos conselhos e sei que, da mesma forma que uma mãe sempre quer o melhor para seus filhos, sempre quis o melhor para mim. E ao professor Roger! Agradeço desde o primeiro contato feito para me incentivar a fazer a prova de seleção da pós-graduação. Para mim, mais que uma relação entre professor/aluno, nos tornamos bons amigos. Sei que Deus utiliza ferramentas para realizar suas obras na vida das pessoas e não há dúvidas de que vocês foram essas ferramentas usadas por Ele na minha.

Agradeço a todos os professores deste programa de pós-graduação pelo empenho em ensinar a alunos como eu aquilo que sabem em excelência. Por fim agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF) da UFES na pessoa da atual coordenadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ivanita Stefanon. Muito obrigado por todo suporte oferecido!

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

Paulo de Tarso (II Timóteo 2:5-7)

# SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>RESUMO</b> .....   | <b>10</b> |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | <b>12</b> |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....   | <b>14</b> |
| <b>LISTA DE TABELAS</b> .....   | <b>15</b> |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....  | <b>16</b> |
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>18</b> |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....  | <b>26</b> |
| 2.1 GERAL.....  | 26        |
| 2.2 ESPECÍFICOS .....   | 26        |
| <b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....  | <b>27</b> |
| 3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....   | 27        |
| 3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS .....  | 27        |
| 3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....   | 28        |
| <b>3.3.1 Castração</b> .....  | <b>28</b> |
| <b>3.3.2 Tratamento com Testosterona (Tes)</b> .....                                    | <b>28</b> |
| <b>3.3.3 Avaliação não Invasiva da Pressão arterial (Pletismografia de cauda)</b> ..... | <b>29</b> |
| <b>3.3.4 Estudos em Coração Isolado (Método Langendorff)</b> .....                      | <b>30</b> |
| <b>3.3.6 Dosagens Sorológicas</b> .....   | <b>32</b> |
| 3.4 ANÁLISES DOS DADOS .....  | 33        |
| <b>4 RESULTADOS</b> .....   | <b>34</b> |
| 4.1 PESO CORPORAL E DAS CÂMARAS CARDÍACAS .....   | 34        |
| 4.2 PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS) .....  | 35        |
| 4.3 REATIVIDADE VASCULAR (MÉTODO LANGENDORFF) .....                                     | 36        |



|  |           |
|--|-----------|
| <b>4.3.1 Pressão de perfusão coronariana (PPC) .....</b> | <b>36</b> |
| <b>4.3.2 Reatividade Vascular Coronariana.....</b>       | <b>37</b> |
| <b>4.6 DOSAGEM SOROLÓGICA.....</b>                       | <b>40</b> |
| <b>4.6.1 Perfil Hormonal .....</b>                       | <b>40</b> |
| <b>4.6.2 Perfil Lipídico .....</b>                       | <b>42</b> |
| <b>5 DISCUSSÃO .....</b>                                 | <b>44</b> |
| <b>6 CONCLUSÃO .....</b>                                 | <b>54</b> |
| <b>7 REFERÊNCIAS.....</b>                                | <b>55</b> |

## RESUMO

As doenças cardiovasculares lideram a causa de morte mundial e o fato dos homens serem mais acometidos fizeram com que a testosterona fosse pensada como uma substância deletéria ao sistema cardiovascular. Contudo, estudos mais recentes contestam essa hipótese e sugerem um papel benéfico desse hormônio sobre o sistema cardiovascular. Não obstante, os efeitos do tratamento crônico com testosterona sobre a função vascular dependente do endotélio, ainda não foram totalmente esclarecidos. Diante disso, o presente estudo foi desenvolvido para determinar os efeitos do tratamento crônico com diferentes doses de testosterona sobre a reatividade vascular coronariana induzida pela bradicinina. Foram utilizados ratos Wistar, machos, com 10 semanas de idade, que foram separados em grupos Sham e Castrados. Os animais castrados foram imediatamente tratados com doses fisiológica (Fisio, 0,5 mg/Kg/dia, sc) e suprafisiológica (Supra, 2,5 mg/Kg/dia, sc) de testosterona por 15 dias. A pressão arterial sistólica (PAS) foi avaliada por pletismografia de cauda, ao final do tratamento. Após eutanásia os corações foram removidos e a reatividade vascular coronariana foi avaliada pela técnica de perfusão retrograda de Langendorff. Curva dose resposta de bradicinina (BK) foi construída seguida por inibições com 100  $\mu$ M L-NAME, 2,8  $\mu$ M indometacina (INDO), L-NAME + INDO ou L-NAME + INDO + 0,75  $\mu$ M clotrimazol (CLOT). Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM e a comparação entre os grupos foi realizada por ANOVA de 1 ou 2 vias seguidos do *post-hoc* de Tukey ( $p < 0,05$ ). Observamos significativa vasodilatação coronariana dependente do endotélio, induzida pela BK, que foi abolida no grupo castrado e restaurada no grupo Fisio e Supra. Após inibição conjugada dos fatores de relaxamento dependente do endotélio (NO, PGI<sub>2</sub> e EDHF), observamos que a vasodilatação foi abolida em todos os grupos. A castração modulou o perfil lipídico e hormonal, bem como reduziu o peso corporal e a reposição com testosterona foi capaz de restaurar todos esses parâmetros. Observamos ainda aumento significativo dos níveis pressóricos no grupo Supra. Nossos dados nos levam a concluir que concentrações fisiológicas de testosterona podem exercer um papel benéfico ao sistema cardiovascular por manter um ambiente favorável à

ação de um vasodilatador dependente do endotélio, sem aumento de PAS, o que faz desse esteroide uma possível ferramenta em terapias hormonais.

**Palavras-chave:** Artérias coronárias, testosterona, reposição hormonal endotélio, vasodilatação.

## ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the leading cause of death in world and the fact that men are more affected meant that the testosterone was thought of as a harmful substance to the cardiovascular system. However, more recent studies have challenged this hypothesis and suggest a beneficial role of this hormone on the cardiovascular system. Nevertheless, the effects of chronic testosterone treatment on vascular endothelium-dependent function, have not been fully clarified. Thus, the present study was designed to determine the effects of chronic treatment with different doses of testosterone on coronary vascular reactivity induced by bradykinin. Males Wistar rats were used with 10 weeks of age, who were separated in Sham and castrated groups. Castrated rats were immediately treated with physiological (Physio, 0.5 mg / kg / day, sc) and supraphysiological (Supra, 2.5 mg / kg / day, sc) doses of testosterone for 15 days. Systolic blood pressure (SBP) was measured by tail plethysmography at the end of treatment. After euthanasia, the hearts were removed and coronary vascular reactivity was assessed by retrograde perfusion technique Langendorff. Dose response curve of bradykinin (BK) was then constructed by inhibition with 100 mM L-NAME, 2.8 uM indomethacin (INDO), L-NAME + INDO or L-NAME + INDO + 0.75 uM clotrimazole (CLOT). Data were expressed as mean  $\pm$  SEM and the comparison between groups was performed by one or two-way ANOVA followed by the post-hoc Tukey test ( $p < 0.05$ ). We observed significant coronary endothelium-dependent vasodilation induced by BK, which was abolished in castrated group and restored in Physio and Supra group. After conjugated inhibition of endothelium-dependent relaxation factors (NO, PGI<sub>2</sub> and EDHF), we found that vasodilation was abolished in all groups. Castration modulated lipid and hormonal profile, as well as reduced body weight and replacement with testosterone was able to restore all of these parameters. We also observed a significant increase in blood pressure in Supra group. Our data lead us to conclude that testosterone physiological concentrations may play a beneficial role in cardiovascular system to maintain a favorable environment for the action of an endothelium-dependent vasodilator, with no increase in SBP, which makes this steroid a possible tool in hormone therapies.

**Keywords:** Coronary arteries, testosterone, hormone replacement, endothelium, vasodilatation.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Pressão arterial sistólica de ratos normotensos nos grupos: SHAM, CAST, FISIO e SUPRA. .... 35
- Figura 2:** Pressão de perfusão coronariana (PPC) basal de ratos normotensos nos grupos: SHAM, CAST, FISIO e SUPRA ..... 36
- Figura 3:** Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes de bradicinina (BK - 0,1 – 1000 ng) antes (A) e após inibição com L-NAME (B), indometacina (C, INDO); L-NAME + INDO (D) e L-NAME + INDO + clotrimazol (E)..... 39
- Figura 4:** Níveis hormonais de: A) Testosterona, B) Estrogênio e C) Progesterona dos grupos SHAM, CAST, FISIO e SUPRA..... 41
- Figura 5:** Perfil lipídico de ratos normotensos. A) Triglicerídeos; B) Colesterol Total; C) Lipoproteína de muito baixa densidade – VLDL; D) Lipoproteína de baixa densidade - LDL e E) Lipoproteína de alta densidade – HDL, dos grupos SHAM, CAST, FISIO e SUPRA..... 43

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Peso corporal e relação do peso seco das câmaras cardíacas pelo peso corporal dos grupos SHAM, CAST, FISIO e SUPRA após tratamento de 15 dias testosterona..... 34

**Tabela 2:** Pressão de perfusão coronariana (PPC, mmHg) de ratos normotensos após inibições com: L-NAME (100  $\mu$ M), indometacina (INDO) (2,8  $\mu$ M), L-NAME + INDO ou L-NAME + INDO + clotrimazol (CLOT) (0,75  $\mu$ M)..... 37

## LISTA DE ABREVIATURAS

|  |  |
|--|--|
| <b>AC</b> Adenilato ciclase  | <b>EDRF</b> Fator de relaxamento derivado do endotélio   |
| <b>ADH</b> Antidiurético   | <b>EETs</b> Ácidos epoxieicosatrienoicos   |
| <b>Akt</b> Proteína quinase B  | <b>eNOS</b> Óxido nítrico sintase endotelial   |
| <b>AMPc</b> Monofosfato de adenosina cíclico   | <b>EPM</b> Erro padrão da média  |
| <b>AR</b> Receptor de Andrógeno  | <b>ERK</b> Quinase regulada por sinais extracelulares  |
| <b>AR-A</b> Receptor de Andrógeno A  | <b>FISIO</b> Grupo de animais castrado que foram submetidos ao tratamento com dose fisiológica de testosterona |
| <b>AR-B</b> Receptor de Andrógeno B  | <b>GCs</b> Guanilato ciclase solúvel   |
| <b>AT-1</b> Receptor de angiotensina II tipo 1                                       | <b>GMPc</b> Monofosfato de guanosina cíclico   |
| <b>BH<sub>4</sub></b> Tetrahidrobiopterina   | <b>GTP</b> Trifosfato de guanosina   |
| <b>BK</b> Bradicینina  | <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> Peróxido de hidrogênio   |
| <b>BK<sub>Ca</sub></b> Canais para potássio ativados por cálcio de larga condutância | <b>HDL</b> Lipoproteína de alta densidade  |
| <b>CAST</b> Grupo de animais castrados   | <b>HSL</b> Lipase sensível a hormônio  |
| <b>CLOT</b> Clotrimazol  | <b>IK<sub>Ca</sub></b> Canais para potássio ativados por cálcio de intermediária condutância                   |
| <b>COX</b> Ciclooxygenase  | <b>INDO</b> Indometacina   |
| <b>CT</b> Colesterol total   | <b>IP</b> Receptores de PGI <sub>2</sub>   |
| <b>CYP</b> Citocromo P450  | <b>K<sub>ATP</sub></b> Canais para potássio sensíveis a ATP  |
| <b>DCV</b> Doença cardiovascular   | <b>K<sub>IR</sub></b> Canais para potássio retificadores de influxo  |
| <b>DHEA</b> Desidroepiandrosterona   |  |
| <b>DHT</b> Di-hidrotestosterona  |  |
| <b>DNA</b> Ácido desoxirribonucleico   |  |
| <b>EDHF</b> Fator hiperpolarizante derivado do endotélio                             |  |



**K<sub>v</sub>** Canais para potássio ativados por voltagem

**LDL** Lipoproteína de baixa densidade

**L-NAME** N<sup>ω</sup>-nitro-L-Arginina Metil Éster

**LPL** Lipase lipoprotéica

**MAPK** Proteína quinase ativada por mitógenos

**MMP-9** Matrix de metalopeptidase- 9

**NADPH** Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

**nNOS** Óxido nítrico sintase neuronal

**NO** Óxido nítrico

**NOS** NO sintase

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** Ânion superóxido

**PAS** Pressão arterial sistólica

**PGI<sup>2</sup>** Prostaciclina

**PI3K** Fosfatidilinositol-3-quinase

**PKA** Proteína quinase A

**PKC** Proteína quinase C

**PKG** Proteína quinase G

**PLA2** Fosfolipase A2

**PPC** Pressão de perfusão coronariana

**SCV** Sistema cardiovascular

**SHAM** Grupo de animais submetidos à cirurgia fictícia – Controle

**SHBG** Globulina de ligação de hormônios sexuais

**SK<sub>Ca</sub>** Canais para potássio ativados por cálcio de baixa condutância

**SOD** Superóxido dismutase

**SRAA** Sistema renina angiotensina aldosterona

**SUPRA** Grupo de animais castrado que foram submetidos ao tratamento com dose suprafisiológica de testosterona

**TG** Triglicerídeos

**VD** Ventrículo direito

**VE** Ventrículo esquerdo

**VEGF** Fator de crescimento endotelial vascular

**VLDL** Lipoproteína de muito baixa densidade

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) compreendem a maior causa de morte em mundial, e estimavas apontavam que a mortalidade por DCV permaneceria liderando as causas de morte ao longo do século 21 (Murray & Lopez, 1997), e estudos têm confirmado essas estimativas (Mosca *et al.*, 2007). Dente as DCV, a doença arterial coronariana assume uma parcela importante destes casos (Fuster *et al.*, 1992).

Estudos recentes têm demonstrado que homens possuem maior risco de desenvolverem DCV, quando comparados a mulheres em idade fértil (Chen *et al.*, 2012). Este fato sustenta a hipótese de uma discrepância relacionada ao sexo, e atribui ao estrogênio um papel protetor para o sistema cardiovascular (SCV) (Farhat *et a al.*, 1996; Mosca *et al.*, 2007), o que evidenciado quando essa proteção cessa com a menopausa (Farhat *et al.*, 1996). Entretanto, Montalcini *et al.* (2007) têm sugerido que o desenvolvimento das DCV na pós-menopausa não é devido somente a redução do estrogênio, mas também a de andrógenos.

Estudos apontam que homens possuem menor expectativa de vida e esse fato pode estar relacionados a fatores ambientais, genéticos ou hormonais, ou então a combinação desses fatores (Liu *et al.*, 2003). Pelo fato dos homens serem mais susceptíveis a eventos cardiovasculares, a testosterona tem sido associada a efeitos deletérios (Adams *et al.*, 1995; Melchert e Welder, 1995). Além disso, estudos têm relacionado a diminuição da testosterona à melhora no relaxamento dependente do endotélio (Herman *et al.*, 1997), e altas doses de testosterona ao prejuízo na reatividade vascular de artéria braquial de mulheres (McCredie *et al.*, 1998). E ainda, o tratamento com testosterona também foi associado a maiores respostas pressóricas em corações isolados de cobaias machos (Schrör *et al.*, 1994) e em artéria coronárias de porco de ambos os sexos, utilizando diferentes agonistas vasoconstritores (Teoh *et al.*, 2000).

Por outro lado, além de não haver evidências claras do efeito deletério da testosterona sobre o SCV tanto em animais quanto em humanos, estudos têm demonstrado que a testosterona pode exercer efeitos benéficos sobre o SCV (Liu et al., 2003; Wu & Von Eckardstein, 2003; Traish, 2014). Diante disso, nota-se que os estudos acerca das ações da testosterona não são conclusivos e muitas vezes controversos, o que justifica a realização de nosso estudo.

Morley *et al.* (2000) encontraram que 25 %, dentre uma população de 316 homens, apresentavam níveis de testosterona abaixo do normal, o que poderia contribuir para consequências clínicas, tais como: diminuição da libido e vitalidade, osteoporose, além do aumento da mortalidade, dentre outras complicações (Shores *et al.*, 2006; Zitzmann *et al.*, 2006; Grober, 2014). Com efeito, têm sido mostrado que a terapia de reposição com testosterona tem se mostrado eficaz no tratamento do controle glicêmico, níveis lipídico, além de aumentar a libido e função sexual de homens (Jones *et al.*, 2011).

Recentemente tem surgido o interesse do uso de testosterona como parte da terapia hormonal em mulheres pós-menopausa (Sievers *et al.*, 2010). Essa associação tem promovido melhora da capacidade funcional e sensibilidade a insulina, bem como aumento da força física de mulheres idosas (Iellamo *et al.*, 2010). Também foi demonstrado que o uso de testosterona pode melhorar a função sexual e bem estar de mulheres submetidas a histerectomia ou que passaram pela menopausa naturalmente (Shifren *et al.*, 2006).

Além da utilização da testosterona em situações clínicas, os andrógenos têm sido amplamente utilizados para o aumento da força e tamanho muscular (Evans, 2004) tanto por atletas competitivos, visando melhorar a *performance* esportiva, quanto por amadores que buscam interesses estéticos (Evans, 1997; Parkinson & Evans, 2006). Todavia, efeitos adversos como: prejuízo do enchimento diastólico, hipertrofia de ventrículo esquerdo, arritmias, hipertensão, eritrocitose, alteração no perfil de lipoproteínas e trombose, têm sido relatados em consequência do uso abusivo de esteroides anabólicos (Kutscher *et al.*, 2002; Pärssinen & Seppälä, 2002).

Os andrógenos, dentre eles a testosterona, principal andrógeno circulante secretado pelos testículos (Askew *et al.*, 2007), e seu metabólito ativo a 5  $\alpha$ -dihidrotestosterona, são primordiais para o desenvolvimento das características masculinas durante a fase de desenvolvimento embrionário e para maturação sexual na puberdade. Na fase adulta, a testosterona é essencial para manutenção das funções reprodutoras masculinas e comportamento, além de atuar de diversos outros tecidos (Heemers *et al.*, 2006). As ações clássicas da testosterona se dão pela interação do hormônio com seu receptor específico, o receptor de andrógeno (AR), que é um membro da superfamília de receptores nucleares ativados por ligantes, que uma vez estimulado atua como fator de transcrição (Mangelsdorf & Evans, 1995).

Foram identificadas duas isoformas dos ARs codificados pelo mesmo gene: o receptor de andrógeno-A (AR-A) de 87 kDa e o receptor de andrógeno-B (AR-B) de 110 kDa. Essa diferença no peso molecular é devido a falta dos primeiros 187 aminoácidos no AR-A dos 919 existentes no AR-B e (Wilson & McPhaul, 1994; Li & Al-Azzawi, 2009). Ambos ARs são amplamente expressos em uma grande variedade de tecidos (Wilson & McPhaul, 1996). Sabe-se que esses receptores podem se apresentar em células de tecidos que vão desde os órgãos reprodutivos, o que inclui as genitálias femininas e masculinas, testículos, vesícula seminal, próstata, dentre outros e são também encontrados em tecidos não relacionados aos órgãos reprodutivos, a saber: pele, cartilagem, glândulas sebáceas, músculo cardíaco, células do músculo liso vascular e células endoteliais, dentre outras (Negro-Vilar, 1999; Liu *et al.*, 2003).

Na via de ação hormonal clássica da testosterona, também chamada de genômica (Bennett *et al.*, 2010) a ligação do hormônio com seu receptor específico promove uma alteração conformacional permitindo a translocação desse complexo (hormônio-receptor) até o núcleo, pelo poro nuclear, seguido do aumento da fosforilação e formação de homodímero (Claessens *et al.*, 2001) ou heterodímero (Lee *et al.*, 1999). Em seguida, ocorre uma interação desse complexo aos elementos responsivos a andrógenos localizados em

região reguladora dos genes alvo no DNA dando início assim a transcrição gênica (Claessens *et al.*, 2001).

Além desse papel genômico, já bem descrito da testosterona, evidências tem atribuído a testosterona um via de sinalização não-genômica, caracterizada pela velocidade da resposta, que pode ocorrer em segundos e minutos, indicando uma ausência na ação do hormônio-receptor sobre os elementos responsivos a andrógenos e assim ausência das fases de transcrição e tradução gênicas (Bennett *et al.*, 2010).

As ações não-genômicas da testosterona podem envolver a interação do hormônio com seu receptor clássico (AR) (Deenadayalu *et al.*, 2012; Puttabyatappa *et al.*, 2013) ou até mesmo ocorrer de maneira independente desses receptores (Jones *et al.*, 2004; Alvarez *et al.*, 2010). Sabe-se que essas ações podem ter início na membrana plasmática ou no citoplasma, geralmente elevando a concentração do cálcio intracelular, ativação de proteínas quinases, dentre as quais destacam-se: Proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), quinase regulada por sinais extracelulares (ERK), proteína quinase A (PKA), fosfatidilinositol-3-quinase/proteína quinase B (PI3K/Akt), proteína quinase C (PKC) e proteína quinase G (PKG) (Baron *et al.*, 2004; Foradori *et al.*, 2008; Li & Al-Azzawi, 2009; Deenadayalu *et al.*, 2012).

No plasma, apenas 0,5 – 4 % da testosterona estão na sua forma livre (Mendel, 1989). A maior parte da testosterona, cerca de 60 %, circula pelos vasos sanguíneos ligada a uma proteína que exerce alta afinidade pelo esteroide, a SHBG (*sex hormone binding globulin*) e o restante ligado a albumina (Siiteri *et al.*, 1982; Mendel, 1989). O receptor da SHBG já foi descrito em diversos tecidos (Hryb *et al.*, 1985; Krupenko *et al.*, 1994; Fortunati, 1999) e atualmente acredita-se que ele possa pertencer a família dos receptores acoplados à proteína G ou ativamente ligado a uma (Nakhla *et al.*, 1999; Rosner *et al.*, 1999). Heinlein & Chang (2002) demonstraram que a testosterona poderia exercer suas ações por meio da ativação do receptor para SHBG que por sua vez aumentaria as concentrações de AMPc para posteriormente ativar a PKA, dando início a uma resposta celular. Entretanto, esses autores ainda não

descartam a possibilidade de haver um novo subtipo de AR ligado a membrana plasmática (Heinlein & Chang, 2002) fato esse que é sustentado por diversos estudos (Konoplya & Popoff, 1992; Benten *et al.*, 1999; Benten *et al.*, 1999).

Alguns estudos têm mostrado que a testosterona pode exercer ações vasculares rápidas (“extra-nucleares”). Estudos de Puttabyatappa *et al.* (2013) verificaram que a testosterona causava relaxamento vascular em leito, enquanto Toot *et al.* (2011) verificaram o relaxamento em segmento mesentérico de ratos. Também foi observado relaxamento em anéis de aorta de ratos (Bucci *et al.*, 2009), porcos (Deenadayalu *et al.*, 2012) e em artéria basilar de cães (Ramírez-Rosas *et al.*, 2011).

Os efeitos vasoativos da testosterona podem ocorrer por diferentes mecanismos, dentre eles de maneira dependente (Tep-Areenan *et al.*, 2002) ou independente (Deenadayalu *et al.*, 2012) do endotélio. Vale ressaltar que as ações via endotélio estão geralmente relacionadas a administração de testosterona em concentrações fisiológicas, enquanto que concentrações suprafisiológicas conduziriam as ações independente do endotélio (Perusquia & Stallone, 2012; Santos, *et al.*, 2014).

O endotélio é uma monocamada de células epiteliais que até poucas décadas atrás acreditavam ser somente uma barreira semipermeável que revestia a parte interna dos vasos sanguíneos e linfáticos (Flammer & Lüscher, 2010). Estudos realizados na década de 80 descreveram que o endotélio desempenha um papel funcional sobre a reatividade vascular (Furchgott & Zawadzki, 1980). Esse papel se justifica pelo fato das células endoteliais terem a capacidade de responderem a diversos estímulos fisiológicos como, por exemplo, o simples atrito da passagem de sangue pelo vaso (*Shear stress*) ou podem responder a um elevado número de substâncias circulantes no sangue, dentre elas a acetilcolina e bradicinina (BK) (Furchgott & Zawadzki, 1980; Meyrelles *et al.*, 2011). A importância dessas células no controle do tônus vascular se dá pela produção e liberação de fatores de relaxamento derivado do endotélio (EDRFs). A princípio o termo EDRF era atribuído principalmente ao NO até que posteriormente foram reconhecidos vários tipos de EDRFs, que dentre eles

incluíam prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Lüscher & Barton, 1997; Félétou & Vanhoutte, 2006; Michel & Vanhoutte, 2010; Ozkor & Quyyumi, 2011).

A confirmação do NO como EDRF só ocorreu em 1987 (Palmer *et al.*, 1987) e, mais tarde, em 1998, essa descoberta gerou o prêmio Nobel a três grandes pesquisadores: Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro, e Ferid Murad. O NO é um gás solúvel de meia-vida curta (cerca de 5 segundos) que é formado da clivagem da L-arginina e oxigênio molecular, pela NO sintase (NOS), produzindo assim NO e L-citrulina, que é um metabólito inativo. No endotélio, a isoforma endotelial da NOS (eNOS) tem sua atividade marcadamente aumentada com aumento da concentração do cálcio intracelular. O cálcio se liga a calmodulina formando um complexo cálcio/calmodulina que aumenta a transferência de elétrons do domínio oxidase para o domínio redutase da NOS. Para tanto essa reação necessita de cofatores tais como tetrahydrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ) responsável em doar elétrons e o complexo nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato NADPH, que se encarrega do transporte desses elétrons para formação do NO (Förstermann, 2010; Meyrelles *et al.*, 2011; Ohashi *et al.*, 2012).

Uma vez formado, o NO se difunde livremente pelas camadas celulares até alcançar o interior das células do músculo liso vascular adjacente. Já no citoplasma o NO ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs) que catalisa a conversão da trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). O GMPc, por sua vez ativa a PKG. Por consequência, a PKG executa funções celulares. Uma dessas funções é a ativação da enzima fosfatase de cadeia leve da miosina, no músculo liso vascular. Essa enzima desfosforila a miosina no músculo liso tendo como resultado final o relaxamento vascular (Dudzinski *et al.*, 2006).

O aumento das concentrações de GMPc e ativação da PKG também diminuem o influxo de íons cálcio, bem como sua liberação dos estoques intracelulares, além de abrir canais para potássio, promovendo hiperpolarização e relaxamento da musculatura lisa vascular (Arnold *et al.*, 1977; Pacher *et al.*,

2011). O NO ainda pode estimular a atividade da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Gupta *et al.*, 1994), o que pode contribuir para hiperpolarização das células do músculo liso vascular, e ainda inibir a proliferação do músculo liso vascular, agregação plaquetária, adesão de plaquetas e monócitos nas células endoteliais, oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL), expressão e adesão molecular e produção de endotelina (Fleming & Busse, 2003).

Um outro EDRF é o metabólito da ciclooxigenase (COX), a prostaglandina  $\text{I}_2$ , também conhecida como prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ). A  $\text{PGI}_2$  é formada a partir do ácido araquidônico, que é um metabólito da ação da fosfolipase A2 ( $\text{PLA}_2$ ) sobre os fosfolípidios de membrana. (Chang *et al.*, 1987). A  $\text{PGI}_2$  por ser derivado de lípidios, após a produção nas células endoteliais, tem a capacidade de se difundir através da membrana plasmática das células endoteliais e atuar com um vasodilatador no músculo liso vascular. Receptores de  $\text{PGI}_2$  (IP) localizados na membrana das células do músculo liso vascular, quando estimulados induzem a ativação da adenilato ciclase (AC), que aumenta a concentração do AMPc. Uma vez o AMPc formado ele ativa a PKA que dentre múltiplas funções, pode promover relaxamento vascular (Kukovetz *et al.*, 1979).

O terceiro EDRF é o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). A proposta da existência dos EDHFs se deu mediante observações de que mesmo sofrendo influência de inibidores da NOS e da COX o endotélio ainda era capaz de liberar substâncias que hiperpolarizavam as células do músculo liso vascular. (Chen *et al.*, 1988; Vanhoutte, 1987; 2004) causando relaxamento. A hiperpolarização das células lisa vascular mediada pelo endotélio já havia sido demonstrada pelo NO e  $\text{PGI}_2$ , entretanto esses dois mediadores não eram capaz de explicar totalmente o relaxamento dependente do endotélio que era observado (De Mey *et al.*, 1982). Os mecanismos atribuídos tanto as ações do NO quanto da  $\text{PGI}_2$  envolvem a ativação de canais para potássio existente na membrana das células do músculo liso vascular, sendo eles: sensíveis a ATP ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ), de larga condutância ativados por cálcio ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ), retificadores de influxo ( $\text{K}_{\text{IR}}$ ) e os ativados por voltagem ( $\text{K}_{\text{V}}$ ) (Félétou & Vanhoutte, 2006). Por outro lado, a resposta mediada pelo EDHF envolvem a ativação de canais para potássio ativados por cálcio de condutância



intermediária ( $I_{K_{Ca}}$ ) e/ou canais para potássio ativados por cálcio de baixa condutância ( $S_{K_{Ca}}$ ) (Zygmunt *et al.*, 1997; Chataigneau *et al.*, 1998).

Acredita-se que a participação dos EDHFs sejam mais significantes em artérias de resistência, quando comparados com artérias de condutância (Tomioka *et al.*, 1999). Além disso, estudos também destacam que em casos de patologias onde há diminuição da biodisponibilidade do NO como, por exemplo, hipertensão, diabetes, aterosclerose, dentre outras, o EDHF passa a ser um mediador endotelial fundamental em compensar a falta de NO na manutenção do relaxamento e tônus vascular (Félétou & Vanhoutte, 2004; Shimokawa, 2010; Ozkor & Quyyumi, 2011). Ainda não se conhece a real identidade química do EDHF. Entretanto, alguns candidatos foram propostos e dentre eles encontram-se: peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Bény & Von Der Weid 1991; Matoba *et al.*, 2000), anandamida (Randall & Kendall, 1997; Randall & Kendall 1998), íons potássio (Edwards *et al.*, 1998), ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs - metabolitos da ação da citocromo P450 (CYP), sobre o ácido araquidônico) (Baron *et al.*, 1997; Popp *et al.*, 2002), peptídeo natriurético tipo C (Chauhan *et al.*, 2004) e junções comunicantes (Taylor *et al.*, 1998; Griffith, 2004).

Embora as ações diretas da testosterona sobre os vasos tenham sido bem exploradas, os efeitos do tratamento crônico sobre a função vascular dependente do endotélio na circulação coronariana ainda não foram totalmente esclarecidos. Claudio *et al.* (2013) encontraram que a castração induziu uma disfunção endotelial em coronárias de ratas. Contudo, não há relatos, em machos, de que a privação da testosterona, dada pela castração, possa levar a disfunção endotelial. Diante disso, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar os efeitos da castração e do tratamento crônico com testosterona sobre a reatividade vascular coronariana dependente do endotélio em ratos Wistar.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar os efeitos do tratamento crônico com testosterona sobre a reatividade vascular coronariana dependente do endotélio em ratos Wistar.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da castração sobre a pressão arterial sistólica (PAS) e pressão de perfusão coronariana (PPC) em ratos normotensos;
- Verificar os efeitos do tratamento com doses fisiológicas e suprafisiológicas de testosterona sobre a PAS e PPC de ratos normotensos castrados;
- Avaliar a ação vasodilatadora induzida pela BK em ratos normotensos castrados e tratados com doses fisiológicas e suprafisiológicas de testosterona, mediante a:
  - Inibição da síntese do óxido nítrico (NO);
  - Inibição da síntese de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>);
  - Inibição combinada da síntese de NO e PGI<sub>2</sub>;
  - Inibição combinada da síntese de NO, PGI<sub>2</sub> e do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF).
- Determinar o perfil hormonal e lipídico de ratos normotensos castrados e animais castrados submetidos ao tratamento com doses fisiológicas e suprafisiológicas de testosterona.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos machos adultos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com 10 semanas de idade, fornecidos pelo biotério central do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Todos os procedimentos utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFES sob parecer número 049/2012.

Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, cinco animais por gaiola, que permitiam o livre acesso à água e ração (Purina Labina), em ambiente sob condições de temperatura (22-24 °C) e umidade (40-60 %) controladas. O ciclo de luz foi ajustado para períodos de 12/12 horas alternando entre claro e escuro.

### 3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram aleatoriamente separados em quatro diferentes grupos experimentais, a saber:

- Controle (SHAM);
- Castrado (CAST);
- Castrado + Tratados com dose fisiológica de testosterona (FISIO);
- Castrado + Tratados com dose suprafisiológica de testosterona (SUPRA).

### 3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Esse estudo contou com os seguintes procedimentos experimentais:

- Castração;
- Tratamento com diferentes doses de testosterona por 15 dias;
- Aferição da PAS por pletismografia de calda;
- Coleta de sangue para avaliação do perfil hormonal e lipídico;
- Isolamento do coração para avaliação funcional do leito coronariano.

#### 3.3.1 Castração

Para realização da castração, após anestesia com hidrato de cloral (40 mg/Kg, i.p), o animal foi posicionado em decúbito dorsal e imobilizado com fita adesiva sobre a prancha cirúrgica. Antes da incisão, foi realizada desinfecção com álcool iodado em toda região da bolsa testicular. A cirurgia foi realizada por meio de uma incisão na região da linha mediana da bolsa testicular, em seguida, os testículos foram expostos por compressão. Com testículo exposto, seguiu-se com abertura da túnica *vaginalis* e ligadura dos testículos, com linhas absorvíveis, feita em torno do cordão espermático. Ao término, os testículos foram removidos e a bolsa testicular suturada. O grupo controle foi submetido à cirurgia fictícia (SHAM), seguindo os mesmos procedimentos e em tempo equivalente, exceto a retirada dos testículos. Ao final, os animais receberam uma dose de antibiótico (Enrofloxacina - 2,5 % - 0,1 mL – i.m) com intuito de evitar possíveis infecções.

#### 3.3.2 Tratamento com Testosterona (Tes)

Neste estudo utilizou-se de tratamento com diferentes doses de testosterona. Para tanto, o tratamento com reposição de testosterona (Testosterona Bioidêntica – IMAFAR) foi realizado durante período de 15 dias via injeções

subcutânea nas seguintes concentrações: 0,5 mg/kg/dia, mimetizando concentração fisiológica, como previamente realizado (Moysés *et al.*, 2001) ou 2,5 mg/kg/dia, como dose suprafisiológica. Os grupos que não receberam o tratamento com testosterona tiveram o mesmo volume administrado contendo somente veículo utilizado para diluir o esteroide (óleo de girassol) (Moysés *et al.*, 2001). Os animais que foram tratados com testosterona receberam a primeira dose no mesmo dia da castração para evitar a baixa hormonal pós-cirurgia.

### **3.3.3 Avaliação não Invasiva da Pressão arterial (Pletismografia de cauda)**

Antes da obtenção dos dados de pressão arterial, fez-se necessário um período de adaptação dos animais ao equipamento a ser utilizado (*IITC INC/Life Science, 23924 Victory Blvd, Woodland Hills, Ca 91367-1253 USA*) por cerca de 10 minutos durante os três dias que precederam a coleta dos dados, com intuito de minimizar a influência do estresse sobre a pressão arterial.

Para aquisição dos dados, os animais foram acomodados em câmara aquecida, dentro de um contentor com um *cuff* de pulso pneumático acoplado na região proximal da cauda. Um esfigmomanômetro foi insuflado e desinsuflado automaticamente e o valor de PAS foi obtido por meio de sinais do transdutor acoplado a um computador, como descrito na literatura (Baldo *et al.*, 2011).

A temperatura foi controlada entre 29 e 32 ° C durante 40 minutos, tempo em que o animal permaneceu no equipamento. Foi obtida a média de três registros com diferença máxima de 10 mmHg, sendo descartados os registros associados às influências causadas por movimentos dos animais. Os registros foram coletados um dia antes da última dose do tratamento.

### 3.3.4 Estudos em Coração Isolado (Método Langendorff)

Neste experimento, foi investigada a reatividade vascular do leito coronariano em resposta a doses de BK. Para tanto, após o final do tratamento, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (40 mg/Kg, i.p) e eutanasiados por decapitação para coleta de sangue. Imediatamente após coleta sanguínea, esses animais tiveram a cavidade torácica aberta, o coração exposto e dissecado de suas conexões e rapidamente transferido para o aparelho de perfusão isolada por meio da canulação da aorta, no nível de sua curvatura. Em seguida, a perfusão retrógrada foi realizada pelo método de Langendorff modificado (Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten, Alemanha) sendo que, para a perfusão foi utilizada uma solução nutritora composta de NaCl, 120 mM; CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 1,25 mM; KCl, 5,4 mM; MgSO<sub>4</sub> .7H<sub>2</sub>O, 2,5 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> .H<sub>2</sub>O, 2,0 mM; NaHCO<sub>3</sub> , 27,0 mM; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> , 1,2 mM; EDTA, 0,03 mM e glicose 11,0 mM, mantida a 37 °C por meio de um banho-maria, e continuamente pressurizada por mistura carbogênica (95 % O<sub>2</sub> e 5 % CO<sub>2</sub>) na câmara de saturação, mantendo um pH estável em 7,4. O fluxo coronariano foi mantido constante em 10 mL/min por uma bomba de rolete (Hugo Sachs, Germany).

A PPC basal foi avaliada por meio de um transdutor de pressão (AD Instrument MLT0380/A Reusable BP Transducer), conectado imediatamente próximo da cânula de perfusão aórtica, através da qual foi perfundido o leito coronariano, ligado a um sistema digital de aquisição de dados (PowerLab Sistem). Para leitura dos registros obtidos pelo sistema de aquisição de dados foi utilizado software LabChart 7.3.1 (Copyright © 1994-2011 ADInstruments). Como o fluxo foi mantido constante em 10 mL/min, por meio da bomba de rolete, as alterações da PPC puderam ser diretamente relacionadas às mudanças na resistência vascular.

A pressão isovolumétrica do ventrículo esquerdo foi mantida por meio de um balão de látex que, ainda vazio, era inserido no interior do ventrículo esquerdo (VE) por meio de uma cânula de aço conectada a um transdutor de pressão (AD Instrument MLT0380/A Reusable BP Transducer). Uma vez dentro do VE,

o balão era pressurizado, com água, com auxílio de uma seringa de vidro de forma a manter uma pressão diastólica intraventricular de 10 mmHg.

Após 40 minutos de estabilização da preparação de coração isolado, a PPC basal foi determinada e dava-se início ao estudo da reatividade coronariana por meio da construção de uma curva dose-resposta de BK (Sigma, St. Louis, MO) administrada *in bolus* (0,1 mL) em concentrações crescentes de (0,1 - 1000 ng) antes e após a perfusão com inibição individual ou combinada dos EDRFs, conforme protocolo experimental.

Os corações que passaram pela avaliação funcional tiveram as câmaras cardíacas cuidadosamente separadas e pesadas em balança de precisão (SHIMADZU AU Y 220) após 24 horas de secagem em estufa a 100 ° C para obtenção do peso seco.

#### 3.3.4.1 Protocolo Experimental:

##### **Protocolo 1**

Com objetivo de avaliar a participação do NO na resposta vasodilatadora da BK nos vasos coronários, um inibidor inespecífico da NOS, N $\omega$ -nitro-L-Arginina Metil Éster (L-NAME, 100  $\mu$ M), foi adicionado à solução de perfusão durante pelo menos 20 minutos e a curva dose-resposta à BK foi realizada (Santos *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2010).

##### **Protocolo 2**

Com objetivo de avaliar a participação da PGI $_2$ , na resposta vasodilatadora da BK nos vasos coronários, um inibidor inespecífico da enzima COX, indometacina (INDO; 2,8  $\mu$ M), foi adicionado à solução de perfusão durante pelo menos 20 minutos e a curva dose-resposta à BK foi realizada (Santos *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2010).

### **Protocolo 3**

Com objetivo de avaliar a resposta vasodilatadora independente de NO/PGI<sub>2</sub> induzida pela BK nos vasos coronarianos, foi realizada inibição combinada das enzimas NOS e COX com L-NAME (100 µM) e INDO (2,8 µM) respectivamente. Ambos inibidores foram adicionados, simultaneamente, à solução de perfusão pelo menos 20 minutos antes da curva dose-resposta à BK ser construída (Santos *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2010).

### **Protocolo 4**

Com objetivo de avaliar a resposta vasodilatadora independente de NO/PGI<sub>2</sub>/EDHF induzida pela BK nos vasos coronarianos, foi realizada inibição combinada das enzimas NOS, COX e CYP com L-NAME (100 µM), Indometacina (2,8 µM) e clotrimazol (CLOT; 0,75 µM) respectivamente. Todos inibidores foram adicionados, simultaneamente, à solução de perfusão pelo menos 20 minutos antes da curva dose-resposta à BK ser construída (Santos *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2010).

### **3.3.6 Dosagens Sorológicas**

#### **3.3.6.1- Perfil Hormonal**

Para realização das dosagens sorológicas foram coletados 5 mL de amostras de sangue pelo método de decapitação no último dia de tratamento. Em seguida, o sangue foi centrifugado (Excelsa® IV Modelo 280r) a 3500 rpm durante 15 minutos a 4 °C, o soro foi retirado e estocado à -20 °C. As concentrações de estrogênio, progesterona e testosterona foram determinadas por imunoenensaio de eletroquimioluminescência utilizando kit enzimático Cobas® e quantificado em analisador Roche Elecsys® 2010.



### 3.3.6.2.- Perfil Lipídico

Após isolamento do soro, como mencionado acima, as concentrações de colesterol total (CT), triglicérides (TG) e lipoproteína de alta densidade (HDL) foram determinados pelo método enzimático de Kits Colestat Enzimático AA, TG Color GPO/PAP AA e HDL Colesterol Monofase AA Plus respectivamente em espectrofotômetro Konelab, modelo 600i. As concentrações de LDL e lipoproteína de muito baixa densidade VLDL foram determinadas utilizando a equação de Friedewald (Friedewald *et al.*, 1972): Colesterol VLDL = Triglicérides/5 e Colesterol LDL = Colesterol total - (HDL + VLDL).

## 3.4 ANÁLISES DOS DADOS

A análise dos dados foi realizada com auxílio do programa estatístico Graph-Pad Prism 6. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A comparação entre os grupos foi realizada por meio da análise de variância de uma via (one-way ANOVA). Para a análise da resposta vasodilatadora a bradicinina foi utilizada a análise de variância de duas vias (two-way ANOVA). Nos dois casos, foi utilizado o teste *post-hoc* de Tukey, e o nível de significância foi estabelecido para valores de  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 PESO CORPORAL E DAS CÂMARAS CARDÍACAS

Conforme pode ser observado na Tabela 1, a castração foi capaz de reduzir significativamente o peso corporal quando comparado com ratos SHAM ( $358 \pm 4$  para  $325 \pm 7$  g). Contudo, o tratamento com testosterona preveniu a perda de peso após castração, tanto dos animais que receberam dose fisiológica ( $338 \pm 7$  g) quanto dos que receberam dose suprafisiológica ( $347 \pm 6$  g) de testosterona.

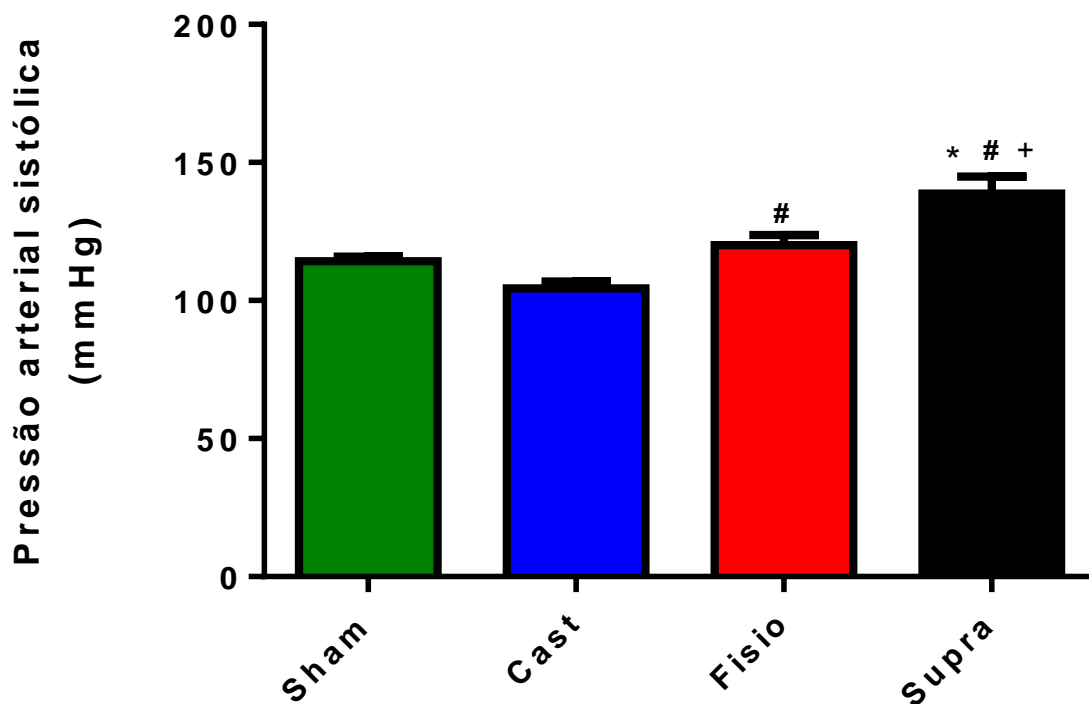
Em relação ao peso das câmaras cardíacas, a castração não alterou o peso do ventrículo direito (VD;  $1,03 \pm 0,03$  para  $1,06 \pm 0,02$  mg/g) e VE ( $3,99 \pm 0,05$  para  $3,97 \pm 0,05$  mg/g) quando comparados com grupo SHAM. Além disso, o peso das câmaras cardíacas não foi modificado pela reposição com as diferentes doses de testosterona (Tabela 1).

| Parâmetros          | N    | SHAM            | N    | CAST            | N    | FISIO           | N    | SUPRA           |
|---------------------|------|-----------------|------|-----------------|------|-----------------|------|-----------------|
| Peso Corporal (g)   | (30) | $358 \pm 4$     | (33) | $325 \pm 7^*$   | (31) | $338 \pm 7$     | (32) | $347 \pm 6$     |
| Peso seco VD (mg/g) | (16) | $1,03 \pm 0,03$ | (20) | $1,06 \pm 0,02$ | (24) | $1,06 \pm 0,03$ | (24) | $1,04 \pm 0,02$ |
| Peso seco VE (mg/g) | (16) | $3,99 \pm 0,05$ | (20) | $3,97 \pm 0,05$ | (24) | $3,97 \pm 0,07$ | (24) | $3,91 \pm 0,06$ |

**Tabela 1:** Peso corporal e relação do peso seco das câmaras cardíacas pelo peso corporal dos grupos SHAM, CAST, FISIO e SUPRA após tratamento de 15 dias testosterona. Os valores foram expressos com média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  comparado com o grupo SHAM.

## 4.2 PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS)

Na figura 1 pode ser observado valores referente a PAS de ratos normotensos. Assim, nota-se que a castração não alterou os valores da PAS, quando comparados com grupo controle (SHAM  $114 \pm 2$  e CAST  $104 \pm 3$  mmHg). Contudo, o tratamento com doses fisiológicas ( $120 \pm 4$  mmHg) foi capaz de elevar significativamente a PAS quando comparado com os animais CAST. Além do mais, a PAS do grupo FISIO não foi diferente do grupo SHAM, e como esperado, os animais que receberam tratamento com doses suprafisiológica tiveram pressão arterial sistólica marcadamente mais elevada ( $139 \pm 6$  mmHg), quando comparados a todos os outros grupos estudados.

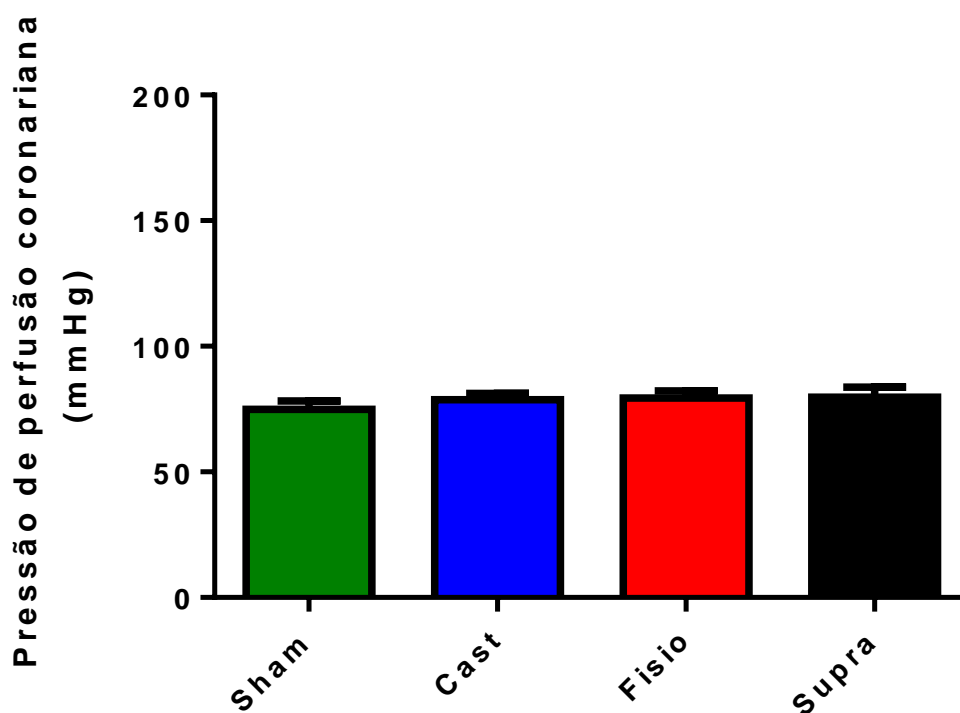


**Figura 1:** Pressão arterial sistólica de ratos normotensos nos grupos: SHAM (n = 15); CAST (n = 15); FISIO (n = 21) e SUPRA (n = 15). Os valores foram expressos com média  $\pm$  EPM. . \* $p < 0,05$  comparado com o grupo SHAM, # $p < 0,05$  comparado com grupo CAST e + $p < 0,05$  comparado com grupo FISIO.

### 4.3 REATIVIDADE VASCULAR (MÉTODO LANGENDORFF)

#### 4.3.1 Pressão de perfusão coronariana (PPC)

Diferente do observado com a PAS, a PPC não foi alterada em nenhum dos grupos estudados (SHAM  $75 \pm 3$ ; CAST  $79 \pm 3$ ; FISIO  $79 \pm 3$  e SUPRA  $80 \pm 4$  mmHg), como mostrado na figura 2. Ou seja, a diminuição da testosterona sérica, mediante castração, e os tratamentos hormonais utilizados neste estudo não foram capazes de modular o tônus basal coronariano.



**Figura 2:** Pressão de perfusão coronariana (PPC) basal de ratos normotensos nos grupos: SHAM (n = 20); CAST (n = 24); FISIO (n = 20) e SUPRA (n = 23). Os valores foram expressos com média  $\pm$  EPM.

Entretanto, após adicionar à solução nutritiva inibidores para a formação de fatores de relaxamento derivados do endotélio, observamos que houve um

aumento significativamente da PPC, embora não tenha havido diferença estatística entre os grupos, conforme mostrado na tabela 2. Ainda que não tenha sido o objetivo desse estudo, o importante papel dos mediadores endoteliais para manutenção do tônus vascular coronariano pode ser visto na tabela 2.

| Grupos | Controle |              | L-NAME |              | INDO |              | L-NAME + INDO |              | L-NAME + INDO + CLOT |              |
|--------|----------|--------------|--------|--------------|------|--------------|---------------|--------------|----------------------|--------------|
|        | (N)      | PPC<br>mm/Hg | (N)    | PPC<br>mm/Hg | (N)  | PPC<br>mm/Hg | (N)           | PPC<br>mm/Hg | (N)                  | PPC<br>mm/Hg |
| SHAM   | (20)     | 75 ± 3       | (9)    | 148 ± 9*     | (9)  | 96 ± 11      | (14)          | 144 ± 9*     | (16)                 | 158 ± 8*     |
| CAST   | (24)     | 79 ± 3       | (12)   | 149 ± 8*     | (15) | 110 ± 6*     | (17)          | 151 ± 6*     | (15)                 | 167 ± 7*     |
| FISIO  | (20)     | 79 ± 3       | (8)    | 144 ± 5*     | (15) | 111 ± 9*     | (11)          | 153 ± 8*     | (11)                 | 158 ± 15*    |
| SUPRA  | (23)     | 80 ± 4       | (10)   | 137 ± 7*     | (14) | 105 ± 7*     | (17)          | 152 ± 6*     | (15)                 | 153 ± 5*     |

**Tabela 2:** Pressão de perfusão coronariana (PPC, mmHg) de ratos normotensos após inibições com: L-NAME (100 µM), indometacina (INDO) (2,8 µM), L-NAME + INDO ou L-NAME + INDO + clotrimazol (CLOT) (0,75 µM). Os valores foram expressos com média ± EPM. \* $p < 0,05$  comparado com respectivo controle.

#### 4.3.2 Reatividade Vascular Coronariana

O principal objetivo desse estudo foi avaliar a reatividade vascular coronariana de ratos normotensos após tratamento de reposição com diferentes concentrações de testosterona. Para tanto, uma curva de relaxamento foi construída com concentrações crescentes de BK administradas diretamente no leito vascular coronariano de ratos (figura 3).

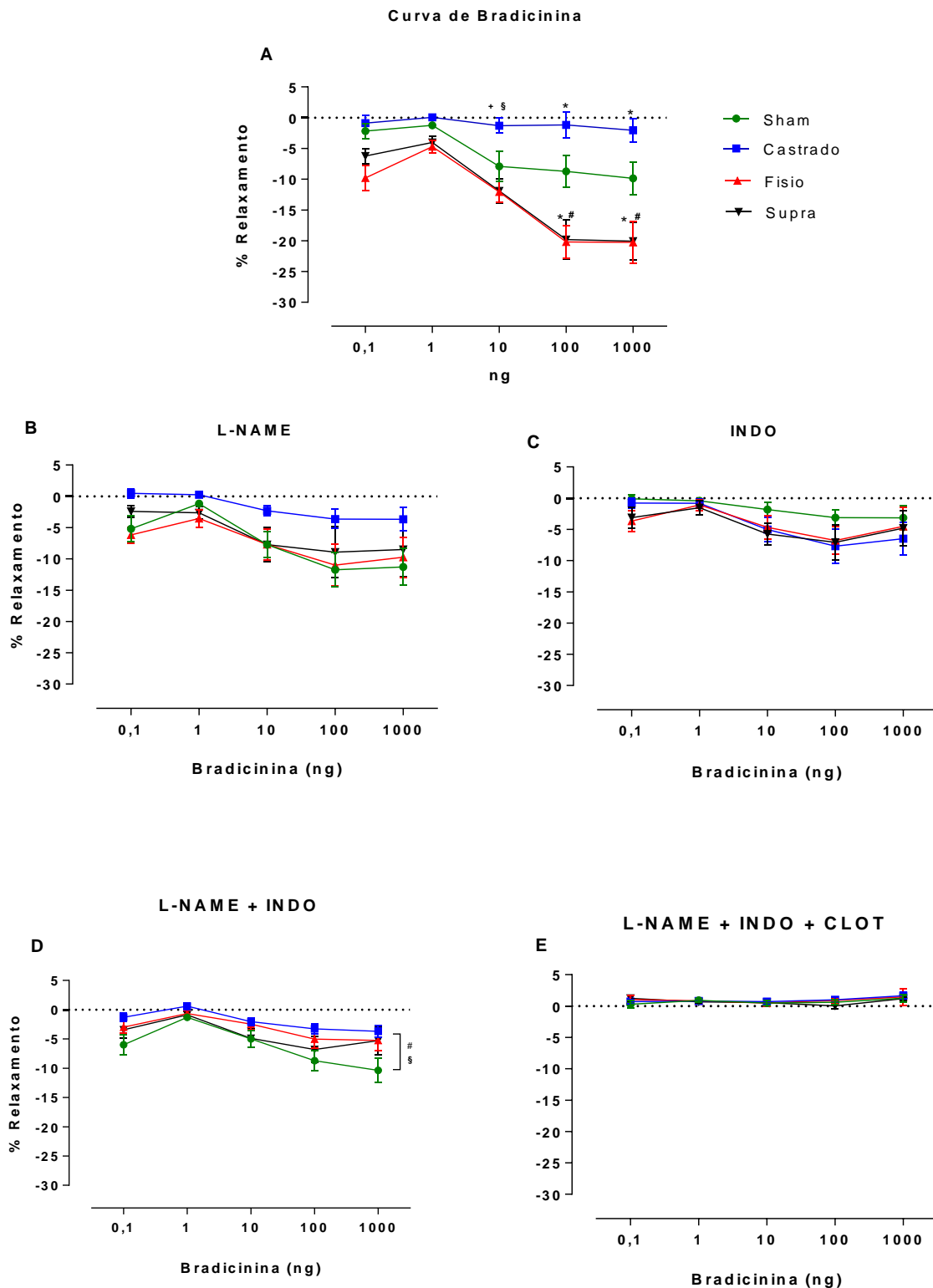
Como pode ser notada na figura 3A, houve progressivo relaxamento no leito coronariano em resposta a BK no grupo SHAM e a castração promoveu grande prejuízo neste relaxamento quando comparado ao grupo SHAM. Contudo, tanto tratamento com doses fisiológicas quanto com doses supra-fisiológicas

foram capazes de prevenir o prejuízo causado pela castração. Curiosamente, ambos os tratamentos não só preveniram a redução do relaxamento ocorrido nos ratos castrados como potencializaram a vasodilatação induzida pela BK quando comparado ao grupo SHAM, sugerindo que a presença desse hormônio circulante se faz necessária para que a bradicinina possa exercer seus efeitos vasodilatadores no modelo experimental estudado.

Entretanto, quando inibida a enzima NOS com 100  $\mu$ M de L-NAME (Figura 3B), pode-se observar uma redução na resposta vasodilatadora, nos grupos FISIO e SUPRA, de modo a acabar com a diferença desses grupos quando comparados ao grupo SHAM. Porém, a resposta do Grupo SHAM não foi alterada pelo L-NAME.

Um comportamento semelhante pôde ser encontrado quando inibida a enzima COX com 2,8  $\mu$ M de INDO (Figura 3C). A inibição da COX foi capaz de reduzir o relaxamento mediado pela BK, principalmente nos grupos FISIO e SUPRA, sugerindo um importante papel desse mediador endotelial nesse modelo estudo.

No entanto, a inibição conjugada com L-NAME + INDO (Figura 3D) foi capaz de reduzir ainda mais o relaxamento dos grupos FISIO e SUPRA ao ponto desse relaxamento se igualar ao grupo CAST. Contudo, o grupo SHAM ainda apresentou relaxamento significativamente maior quando comparado com grupo CAST. Finalmente, a resposta vasodilatadora dependente do endotélio em resposta a BK foi completamente inibida em todos os grupos estudados, quando realizada a inibição conjugada das enzimas NOS, COX e CYP (Figura 3E), mostrando que a vasodilatação vista neste estudo, provavelmente possa ter sido endotélio-dependente.



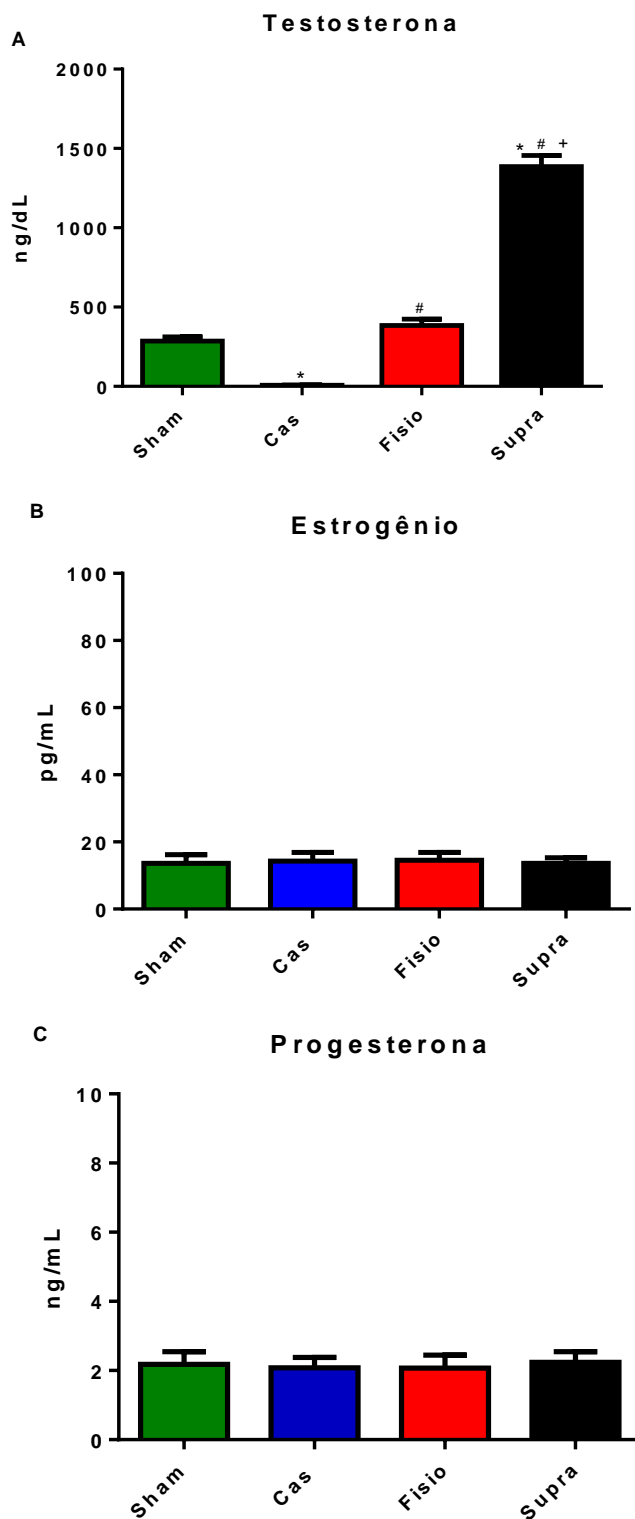
**Figura 3:** Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes de bradicinina (BK - 0,1 – 1000 ng) antes (A) e após inibição com L-NAME (B), indometacina (C, INDO); L-NAME + INDO (D) e L-NAME + INDO + clotrimazol (E, CLOT). Os valores foram expressos com média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  comparado com SHAM, # $p < 0,05$  comparado com CAST, + $p < 0,05$  comparado com FISIO e § $p < 0,05$  comparado com SUPRA.

## 4.6 DOSAGEM SOROLÓGICA

### 4.6.1 Perfil Hormonal

Ao analisar o perfil hormonal (Figura 4), nós confirmamos a efetividade da castração ao observar a redução significativa nos níveis de testosterona no grupo castrado (SHAM  $286 \pm 26$  ng/dL; CAST  $7 \pm 3$  ng/dL). Além disso, o tratamento em doses fisiológicas ( $383 \pm 41$  ng/dL) foi eficaz em manter o nível de testosterona similar ao do grupo SHAM. Por outro lado, os ratos que foram tratados com doses suprafisiológicas tiveram um marcante aumento de testosterona ( $1385 \pm 71$  ng/dL). Não foram observadas alterações nos níveis de estrogênio e progesterona.

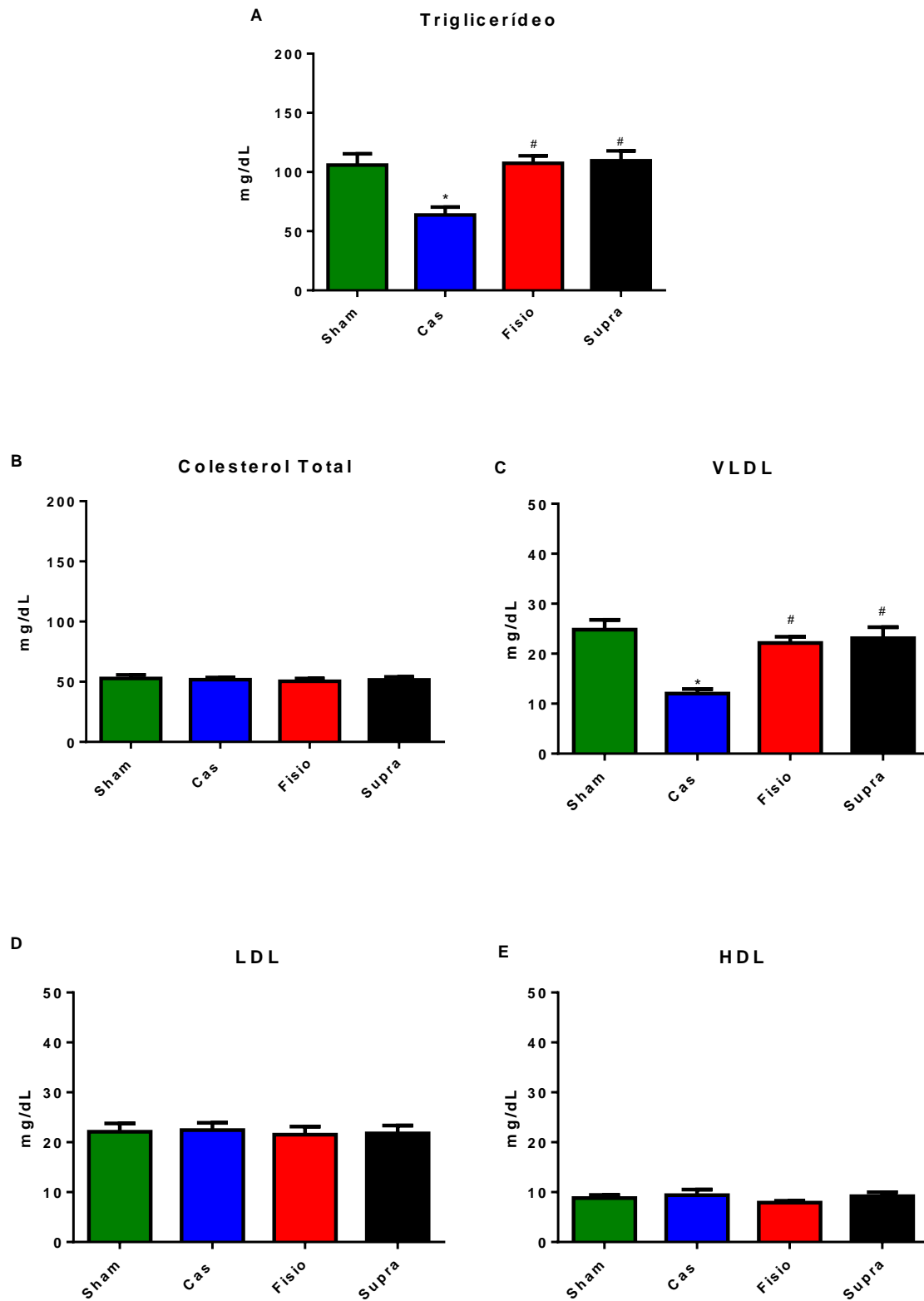




**Figura 4:** Níveis hormonais de: A) Testosterona, B) Estrogênio e C) Progesterona, nos grupos SHAM (n = 17); CAST (n = 16); FISIO (n = 14) e SUPRA (n = 16). Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo SHAM, # $p < 0,05$  comparado ao grupo CAST e + $p < 0,05$  comparado ao grupo FISIO.

#### 4.6.2 Perfil Lipídico

Como demonstrado na Figura 5, podemos observar que os níveis de triglicerídeos tiveram uma significativa redução no grupo CAST quando comparado com o grupo SHAM ( $106 \pm 9$  para  $64 \pm 7$  mg/dL). A reposição hormonal tanto em doses fisiológicas ( $107 \pm 6$  mg/dL) quanto em doses supra-fisiológicas ( $109 \pm 8$  mg/dL) restauraram os níveis de triglicerídeos para valores semelhantes aos do grupo SHAM (Figura 5A). O mesmo ocorreu nos valores de VLDL (Figura 5C), onde também foi verificada significativa redução no grupo CAST ( $12 \pm 1$  mg/dL) quando comparado com grupo SHAM ( $25 \pm 2$  mg/dL). Todavia, tanto o tratamento fisiológico ( $22 \pm 1$  mg/dL) quanto supra-fisiológico ( $23 \pm 2$  mg/dL), mais uma vez, foram capazes de restaurar os valores de VLDL pós-castração. Variáveis como colesterol total, LDL e HDL não foram alteradas nos grupos estudados (Figura 5B, D, E).



**Figura 5:** Perfil lipídico de ratos normotensos. A) Triglicerídeos; B) Colesterol Total; C) Lipoproteína de muito baixa densidade – VLDL; D) Lipoproteína de baixa densidade - LDL e E) Lipoproteína de alta densidade – HDL, dos grupos SHAM (n = 16); CAST (n = 15); FISIO (n = 17) e SUPRA (n = 16). Os dados foram expressos como média ± EPM. \* $p < 0,05$  comparado com SHAM e # $p < 0,05$  comparado com o grupo CAST.

## 5 DISCUSSÃO

O principal achado deste estudo foi à eficácia do tratamento com doses fisiológicas ou suprafisiológicas de testosterona, em prevenir a redução causada pela deficiência hormonal sobre a vasodilatação coronariana dependente do endotélio induzida pela BK. Outros resultados importantes foram que a castração alterou o perfil lipídico e hormonal, bem como reduziu o peso corporal. Verificamos ainda que a reposição com testosterona restaurou todos os parâmetros supracitados igualando-os aos animais SHAM. Mostramos ainda o aumento da pressão arterial sistólica no grupo tratado com doses suprafisiológicas de testosterona.

Nossos resultados mostraram que houve uma diminuição do peso corporal após 15 dias de castração, quando comparado ao grupo SHAM, e o tratamento utilizado neste estudo preveniu essa perda de peso. Tais dados corroboram com Bourghardt *et al.*, (2010) e Langfort *et al.*, (2010) que também encontraram redução do peso corporal após oito e seis semanas de castração, respectivamente. Entretanto, estudos prévios realizados em nosso laboratório (Gomes *et al.*, 2012) demonstraram que a reposição com testosterona, mesmo em altas doses, não foi capaz de elevar o peso corporal de ratos tratados em comparação aos animais controles.

Outros autores demonstraram que animais (Andrade *et al.*, 2008; Bissoli *et al.*, 2009) e humanos (Wang *et al.*, 2012) que são submetidos a tratamento com altas doses de testosterona, possuem maior massa muscular do que seus controles (Andrade *et al.*, 2008; Bissoli *et al.*, 2009). Contudo, apesar de não termos quantificado o conteúdo proteico dos animais, esses estudos reforçam nossas evidências de que, mesmo a testosterona sendo um hormônio anabólico, o aumento do conteúdo proteico não foi suficiente para alterar o peso desses animais, durante o tempo de tratamento utilizado neste estudo, muito embora a hipotestosteronemia fosse capaz de reduzir o peso corporal, possivelmente por reduzir a síntese proteica.

Além da possível perda de massa magra, outra possibilidade em explicar a perda de peso encontrada no grupo CAST pode estar relacionada à diminuição da concentração sérica de triglicerídeos. Em nossos resultados observamos que tanto a concentração de triglicerídeos quanto de VLDL (responsável pelo transporte de triglicerídeos no sangue) foram diminuídas após quinze dias de castração, muito embora o mesmo não tenha sido encontrado em mulheres em idade fértil que faziam tratamento de reposição com testosterona (Wang *et al.*, 2012).

A testosterona tem sido identificada como uma substância que exerce uma correlação negativa sobre obesidade, principalmente em machos. Sabe-se que os andrógenos são capazes de modular a quantidade e distribuição da gordura corporal, de modo que baixo nível de testosterona está associado com a obesidade (Blouin *et al.*, 2008). Além do mais, estudos têm demonstrado que a testosterona reduz a atividade da enzima lipase lipoprotéica (LPL) (Lee *et al.*, 2013) e a modulação sobre essa enzima pode contribuir para alterações no tecido adiposo, especialmente em homens (Ramirez *et al.*, 1997) uma vez que a LPL atua sobre a hidrólise das moléculas de triglicerídeos encontrados em lipoproteínas plasmáticas como quilomicrons e VLDL ácidos graxos e glicerol no qual são transferidos para os adipócitos formando novamente moléculas de triglicerídeos, quadro este denominado de adipogênese (Mead *et al.*, 2002). Sabe-se que, a LPL possui forte correlação com obesidade, balanço energético e desordem metabólica tal como regulação anormal do peso corporal (Wang & Eckel, 2009) e com isso, é possível que a redução da inibição exercida pela testosterona sobre essa enzima possa explicar a diminuição nos níveis de triglicerídeos vista nesses animais.

Estudos também têm demonstrado que a testosterona exerce uma modulação positiva sobre a atividade da enzima lipase sensível a hormônio (HSL) (Langfort *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 1990). A HLS é responsável pela hidrólise dos triglicerídeos estocados nos adipócitos promovendo a liberação de ácidos graxos livres e glicerol no sangue (Jéquier & Tappy, 1999). Diante do fato que a castração é capaz de diminuir a atividade da HLS, nossa sugestão é que com maior tempo de castração, é possível que os animais tenham um maior

depósito de gordura o que tenderia a elevar seu peso corporal. Entretanto, como nossas observações não foram feitas com um tempo maior de castração. Diante disso, mais estudos são necessários para esclarecer melhor os mecanismos associados à ação da testosterona e a composição corporal, principalmente no que se refere à modulação do peso.

Nossos resultados também corroboram dados da literatura no que se refere à PAS, onde tanto a castração quanto a reposição com doses fisiológicas não alteraram a PAS (Zhou *et al.*, 2008). Contudo, os níveis pressóricos foram consideravelmente aumentados no grupo SUPRA. Outros pesquisadores também demonstraram que altas doses de testosterona são capazes de elevar a pressão arterial (Andrade *et al.*, 2008; Bissoli *et al.*, 2009) enquanto que a castração não alterou os níveis pressóricos de ratos normotensos (Zhou *et al.*, 2008).

Já está bem estabelecido pela literatura que a testosterona pode estimular o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), que pela formação de angiotensina II pode elevar a pressão arterial agindo diretamente sobre seu receptor tipo 1 (AT-1) (Peach, 1977; Fischer *et al.*, 2002), que são abundantemente expressos em todo o corpo e atuam contraindo a musculatura lisa vascular (Reid, 1998). Outros mecanismos pelos quais o SRAA pode elevar a pressão estão relacionados liberação de aldosterona (responsável pela reabsorção de sódio nos rins) e pela estimulação direta sobre neurônios simpáticos e por exercer uma inibição sobre os barorreceptores (Peach, 1977; Reid, 1992; Rastogi *et al.*, 2011). Além disso, o SRAA pode estimular o centro da sede, aumentando a ingestão de água e ainda estimular os núcleos hipotalâmicos, aumentando a secreção do hormônio antidiurético (ADH), que por sua vez, diminui a eliminação hídrica corporal pela urina (Reid, 1998). Todos esses mecanismos exercem participação no aumento da pressão arterial.

Reckelhoff *et al.* (2000) descreveram a importante participação do SRAA em aumentar a pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos, sendo influenciado principalmente pela testosterona. Influência essa que é atenuada

quando administrado antagonista do AR (Flutamida 8 mg/Kg) (Reckelhoff *et al.*, 1999), mostrando assim que a testosterona realmente exerce forte participação sobre a regulação da pressão arterial.

Alguns estudos têm demonstrado que a testosterona é capaz de aumentar a expressão tanto de receptores  $\alpha$  (Tsang *et al.*, 2008; Tsang *et al.*, 2009) quanto  $\beta$  (Xu *et al.*, 1991; Tsang *et al.*, 2009) adrenérgicos. Além disso, a testosterona pode modular o metabolismo, estoque, liberação e recaptação de norepinefrina em neurônios simpáticos (Salt, 1972). Todas essas evidências nos levam a sugerir que a testosterona, quando administrada em altas concentrações, como utilizado neste trabalho, pode alterar a expressão desses receptores, como de seu ligante, o que possivelmente poderia contribuir em elevar a pressão arterial.

Além do mais, a ativação do sistema NADPH oxidase também está relacionado ao aumento de pressão arterial (Alderman *et al.*, 1991; Stamler *et al.*, 1989). Förstermann (2010) tem demonstrado que um dos principais estímulos para ativação desse sistema se dá pelo aumento da formação de angiotensina II, que ao se ligar aos receptores AT-1 promove estimulação do complexo NADPH oxidase, que por sua vez aumenta a concentração de espécies reativas de oxigênio com, por exemplo, o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), reduzindo assim a biodisponibilidade do NO. Como a testosterona é um estimulador da formação de Angiotensina II (como já mencionado acima), é esperado que a hipertestosteronemia favorecesse a maior ativação desse sistema, o que pode contribuir para o aumento da PAS como encontrado em nossos animais. E ainda, estudos recentes têm fornecido evidências de que a administração de testosterona em concentrações suprafisiológicas promove vasoconstrição atuando diretamente sobre a musculatura lisa vascular (Perusquia & Stallone, 2012; Santos *et al.*, 2014).

Embora a PAS tenha sido modulada pela testosterona, o mesmo não ocorreu com a PPC. Nossos resultados sugerem que o tônus vascular coronariano de ratos normotensos pode não ser modulado pelo esteróide masculino, ao contrário do que se tem visto em relação ao estrogênio, onde estudos prévios

de nosso laboratório já demonstraram que a castração foi capaz de reduzir a PPC de fêmeas normotensas (Moysés *et al.*, 2001) evidências que apontam para um dimorfismo sexual em relação a ação dos hormônios sexuais sobre o endotélio na manutenção do tônus vascular coronariano. Também, com vem sendo demonstrando pelo nosso laboratório (Santos *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2010), o papel do endotélio na manutenção do tônus pôde ser confirmado após inibições dos EDRFs.

Ainda que não tenhamos observado alterações da PPC nos diferentes grupos, o principal objetivo desse trabalho foi avaliar a reatividade vascular coronariana por meio da vasodilatação dependente do endotélio mediada pela BK. Nossos resultados são claros em demonstrar que o tratamento com testosterona foi eficaz em prevenir o prejuízo na vasodilatação promovido pela castração, quando comparado ao grupo SHAM. Além disso, tanto o tratamento fisiológico quanto suprafisiológico, não só preveniram o prejuízo dado pela castração com também potencializar o relaxamento vascular coronariano.

Os resultados deste estudo demonstram pela primeira vez que a testosterona é capaz de modular a reatividade vascular dependente do endotélio no leito coronariano de ratos. Sabe-se que a testosterona pode modular diretamente o SCV relaxando o músculo liso vascular de maneira rápida e não-genômica como mostrado em diversos estudos (Bucci *et al.*, 2009; Toot *et al.*, 2011; Ramírez-Rosas *et al.*, 2011; Deenadayalu *et al.*, 2012; Puttabyatappa *et al.*, 2013). Estudos também têm mostrado que administração de testosterona em segmentos de artérias coronárias promove vasodilatação por meio de mudanças no fluxo através de canais iônicos, alterando o fluxo de canais para potássio (Tep-Areenan *et al.*, 2002; Deenadayalu *et al.*, 2012) e de canais para cálcio (Jones *et al.*, 2003; Montañó *et al.*, 2008). Outros pesquisadores demonstraram que a testosterona pode exercer suas funções vasodilatadoras ao se ligar em seu receptor clássico (AR) (Deenadayalu *et al.*, 2012; Puttabyatappa *et al.*, 2013) ou até mesmo de forma independente do seu receptor (Jones *et al.*, 2004; Alvarez *et al.*, 2010). Entretanto, em nosso trabalho foi possível demonstrar a ação clássica da testosterona em manter um



ambiente vascular favorável para a ação de um agonista vasodilatador que age sobre o endotélio.

Apesar de não termos dados que comprovem a ação da testosterona em manter esse ambiente vascular favorável, nossa sugestão é que a castração possa ter promovido uma disfunção endotelial, essa que foi prevenida pela reposição com testosterona. Na literatura já foi demonstrado que a ovariectomia induz a disfunção endotelial (Oliveira *et al.*, 2014). Tais evidências nos permitem sugerir que é a deficiência hormonal possa estar envolvida com a disfunção endotelial também em machos. De fato, outros autores têm demonstrado que a castração pode diminuir a expressão de canais para potássio voltagem-dependente (Zhou *et al.*, 2008), o que reduz o efluxo de potássio e assim prejudica o relaxamento vascular, como demonstrado por Ramires-Rosas *et al.*, (2011). Contudo, os mecanismos pelos quais a testosterona pode potencializar a ação de um vasodilatador cujas ações são mediadas pelo endotélio ainda não foram completamente elucidados.

Moyses *et al.* (2001) e Claudio *et al.* (2013) observaram que a vasodilatação coronariana de ratas é prejudicada pela ovariectomia e a reposição com estrogênio restaurou esses efeitos. Claudio *et al.* (2013) observaram ainda que a reposição com estrogênio aumentou a expressão de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), responsável pela dismutação do  $O_2^-$  em  $H_2O_2$  (Peskin & Winterbourn, 2000), aumentando a biodisponibilidade do NO (Meyrelles *et al.*, 2011). Sabe-se também que o estrogênio pode modular tanto a atividade (Chen *et al.*, 1999) quanto a expressão (Weiner *et al.*, 1994) da NOS, aumentando assim a formação de NO. Já no que se trata das ações da testosterona, tem sido demonstrado que quando administrada em altas doses, ela pode promover diminuição da expressão da eNOS, (Skogastierna *et al.*, 2013), principal responsável pela síntese de NO endotelial (Förstermann *et al.*, 1993) o que poderia ocasionar uma disfunção endotelial (Skogastierna *et al.*, 2013). Essa hipótese pode ser justificada uma vez que disfunção endotelial pode ser definida por como uma redução da biodisponibilidade do NO pela reação do NO com espécies reativas de oxigênio ( $O_2^-$ ), levando a formação de

moléculas mais tóxicas, como o peróxido nítrico e/ou radical hidroxila (Meyrelles *et al.*, 2011).

Traish *et al.* (2008) apontam que a disfunção endotelial pode ser caracterizada por vários marcadores e dentre eles a modulação da expressão/atividade da eNOS. Sendo assim, notáveis evidências sugerem que a expressão e atividade da NOS também pode ser regulada pelos andrógenos. Marin *et al.* (1999) demonstraram diminuição da atividade da NOS após castração e evidenciaram ainda que a testosterona pode estar envolvida no aumento da expressão de ambas isoformas constitutivas da NOS (eNOS e sua isoforma neuronal: nNOS). Outros autores estudando células endoteliais de aorta bovina com desidroepiandrosterona (DHEA), esteroide precursor da testosterona, observaram aumento na expressão da eNOS (Williams *et al.*, 2004) e liberação da secreção de NO mediado por vias dependentes da PI3K (Formoso *et al.*, 2006) ou MAPK (Liu & Dillon, 2004). Em outro estudo utilizando células endoteliais de aorta humana (YU *et al.*, 2010) foi demonstrado que a ligação da testosterona em seu receptor (AR) induz uma rápida produção de NO via fosforilação e ativação da eNOS mediada pela PI3K/AKT. Dessa forma, é possível que o hipogonadismo possa modular tais vias de modo a prejudicar a função endotelial em liberar seus fatores de relaxamento.

Em estudos realizados em artérias de homens que apresentavam doença arterial coronariana e faziam uso de testosterona em reposição hormonal também foi demonstrado que o tratamento foi capaz de aumentar o relaxamento vascular em artéria braquial (Ong *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2002). Entretanto, resultados diferentes foram encontrados por Malkin *et al.* (2006), que ao utilizar altas doses do andrógeno demonstrou que a testosterona aumentou a atividade contrátil em resposta a noradrenalina e ainda diminuiu a dilatação em resposta a agonistas vasodilatadores dependente e independente do endotélio. Entretanto, em nosso estudo a administração de doses suprafisiológicas não prejudicou a vasodilatação no leito coronariano.

O fato é que a literatura tem apontado que a deficiência de testosterona pode contribuir para o prejuízo da função endotelial e que terapias de reposição têm

sido eficazes em reestabelecer tanto os danos quanto a função endotelial, aumentando a liberação de NO (Traish & Galoosian, 2013). É conhecido que a testosterona estimula o aumento de expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e matrix de metalopeptidase- 9 (MMP-9) que, junto com aumento da atividade da eNOS, (Eisermann *et al.*, 2013; Fadini *et al.*, 2009), exercem um importante papel tanto na formação de novos vasos quanto das células endoteliais (Hristov *et al.*, 2003; Traish & Galoosian, 2013). O VEGF e MMP-9 são proteínas que estimulam a diferenciação de células endoteliais progenitoras, células essas que são caracterizadas por ser uma linhagem com capacidade de se diferenciar em células endoteliais (Eisermann *et al.*, 2013; Fadini *et al.*, 2009). Além disso, Lu *et al.*, (2007) ainda demonstraram que a castração comprometeu a integridade endotelial por alterar a forma, adesão, ruptura e conexão da estrutura endotelial vascular em ratos *Sprague Dawley*, inferindo que é possível que danos endoteliais possam ser resultado da depleção tanto da testosterona quanto do seu metabólito di-hidrotestosterona (DHT).

Pergola *et al.*, (2003), demonstraram que baixos níveis de testosterona estão associados com um maior surgimento da aterosclerose por meio de alterações na camada íntima da artéria carótida comum em homens adultos. Além disso, estas alterações podem indicar uma coexistência de modificações semelhantes em artérias coronárias. Hak *et al.*, ( 2002) já haviam demonstrado uma forte associação entre baixos níveis de testosterona e aterosclerose severa em aorta de homens. Vale a pena ressaltar que a aterosclerose promove uma disfunção endotelial por apresentar maior contratilidade em resposta ao estiramento e um relaxamento dependente do endotélio prejudicado por meio da menor expressão da eNOS seguido da menor produção de NO (Cavieres *et al.*, 2014).

Tomado em conjunto, nossos dados corroboram a literatura em sustentar a hipótese de que a testosterona exerce realmente um papel fundamental em manter um ambiente vascular saudável. Contudo, como as ações da testosterona sobre as artérias coronarianas não estão totalmente esclarecidas, mais estudos são necessários para melhor esclarecer o papel da testosterona sobre esses vasos.

Como os animais que receberam tratamento com testosterona apresentaram relaxamento superior ao do controle, nosso objetivo foi avaliar qual(ais) mediador(es) endotelial(ais) estaria(m) envolvido(s) nessa ação. Para tanto, nosso primeiro passo foi realizar a inibição da NOS com L-NAME (inibidor inespecífico da NOS). O resultado desse experimento demonstrou que a incubação com o L-NAME reduziu o relaxamento induzido pela BK, levando os dados dos grupos FISIO e SUPRA ao mesmo padrão encontrado no grupo SHAM, indicando assim um importante papel do NO na dilatação das artérias coronárias. De fato, outros autores têm demonstrado que a testosterona pode exercer ação direta sobre as artérias coronarianas promovendo vasodilatação e essa resposta muitas vezes pode envolver a formação de NO endotelial (via eNOS) e/ou de fontes extra-endoteliais (via nNOS) (Deenadayalu *et al.*, 2012). Também já foi demonstrado que a testosterona pode modular tanto a expressão quanto atividade da NOS (Marin *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 2004). Esses achados nos levam a acreditar que além da ação direta da testosterona sobre o músculo e endotélio vascular, ela pode também atuar favorecendo a síntese de substâncias vasoativas pelo endotélio e também favorecendo o relaxamento do músculo liso vascular.

A BK é um potente peptídeo vasodilatador dependente do endotélio e suas ações ocorrem por meio da estimulação dos receptores B<sub>2</sub> endoteliais promovendo liberação de NO, PGI<sub>2</sub> e EDHF (Barrow *et al.*, 1986; Mombouli *et al.*, 1992; O'Kane *et al.*, 1994). Nossos resultados corroboram os dados da literatura, pois, além da importância do NO como mediador do relaxamento à BK, como demonstrado acima, os animais que possuíam a testosterona circulante demonstraram prejuízo no relaxamento induzido pela BK frente inibição da COX (com INDO), enzima responsável pela formação dos prostanóides vasodilatadores. O mesmo pode ser observado quando realizado inibição conjugada com L-NAME e INDO, principalmente nos grupos FISIO e SUPRA, confirmando o importante papel do NO e da PGI<sub>2</sub> no relaxamento aqui observado. Estudos prévios de nosso laboratório já demonstraram a importância dos prostanóides vasodilatadores em machos normotensos frente a outros agonistas vasodilatadores (Santos *et al.*, 2004).

Por fim, como esperado, a resposta vasodilatadora de BK no leito vascular coronariano dos ratos normotensos foi completamente abolida, em todos os grupos quando realizada a inibição dos três mediadores endoteliais. Nesse caso, foi adicionado CLOT (inibidor da CYP) junto com L-NAME e INDO. Esses dados fornecem evidências do importante papel do EDHF no relaxamento induzido pela BK. Frente a estimulação com outros agonistas vasodilatadores, a participação dos metabólitos da CYP, i.e. EETs, como candidatos a EDHF em artérias coronárias já havia sido demonstrada em estudos anteriores realizados em nosso laboratório, tanto em animais normotensos (Santos *et al.*, 2004) quanto em hipertensos (Santos *et al.*, 2010).

## 6 CONCLUSÃO

Em suma, nossos dados sugerem que a testosterona é importante para o SCV e o tratamento com testosterona é capaz de impedir os prejuízos advindos do hipogonadismo, como no modelo experimental estudado. Além disso, nossos dados também sugerem que o tratamento com concentrações fisiológicas de testosterona parece promover benefício cardiovascular. Por outro lado, concentrações suprafisiológicas estariam associadas ao aumento da pressão arterial.

Em conjunto, nossos resultados fornecem evidências de que a testosterona pode atuar propiciando um ambiente adequado a ação de um vasodilatador dependente do endotélio, sugerindo um possível papel benéfico do hormônio masculino sobre o SCV e essa ação possivelmente está associada à sua ação clássica, atuando por vias genômicas. Dessa forma, as ações benéficas da testosterona sobre o SCV representam uma realidade atual, o que a torna uma ferramenta útil para o desenvolvimento de melhores formas de terapia em situações de deficiência hormonal.

## 7 REFERÊNCIAS

Adams MR, Williams JK, Kaplan JR. Effects of Androgens on Coronary Artery Atherosclerosis and Atherosclerosis-Related Impairment of Vascular Responsiveness. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1995; 15(5): 562–570.

Alderman MH, Madhavan S, Ooi WL, Cohen H, Sealey JE, Laragh, JH. Association of the renin-sodium profile with the risk of myocardial infarction in patients with hypertension. *The New England journal of medicine* 1991; 324(16): 1098–1104.

Alvarez E, Cairrão E, Morgado M, Morais C, Verde I. Testosterone and cholesterol vasodilation of rat aorta involves L-type calcium channel inhibition. *Advances in pharmacological sciences* 2010; 2010: 01–10.

Andrade TU, Santos MCS, Busato VCW, Medeiros ARS, Abreu GR, Moysés MR, Bissoli NS. Higher physiological doses of nandrolone decanoate do not influence the Bezold-Jarish reflex control of bradycardia. *Archives of medical research* 2008; 39(1): 27–32.

Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977; 74(8): 3203–3207.

Baldo MP, Forechi L, Morra EA, Zaniqueli D, Machado RC, Lunz W, Rodrigues SL, Mill JG. Long-term use of low-dose spironolactone in spontaneously hypertensive rats: effects on left ventricular hypertrophy and stiffness. *Pharmacological reports* 2011; 63(4): 975–982.

Baron A, Frieden M, Bény JL. Epoxyeicosatrienoic acids activate a high-conductance, Ca (2+)-dependent K + channel on pig coronary artery endothelial cells. *The Journal of physiology* 1997; 504(3): 537–543.

Baron S, Manin M, Beaudoin C, Leotoing L, Communal Y, Veysié G, Morel L. Androgen receptor mediates non-genomic activation of phosphatidylinositol 3-OH kinase in androgen-sensitive epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* 2004; 279(15): 14579–14586.

Barrow SE, Dollery CT, Heavey DJ, Hickling NE, Ritter JM, Vial J. Effect of vasoactive peptides on prostacyclin synthesis in man. *British journal of pharmacology* 1986; 87(1): 243–247.

Bennett NC, Gardiner RA, Hooper JD, Johnson DW, Gobe GC. Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2010; 42(6): 813–827.

Benten WP, Lieberherr M, Giese G, Wrehlke C, Stamm O, Sekeris CE, Mossmann H, Wunderlich F. Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1999; 13(1): 123–133.

Benten WP, Lieberherr M, Stamm O, Wrehlke C, Guo Z, Wunderlich F. Testosterone signaling through internalizable surface receptors in androgen receptor-free macrophages. *Molecular biology of the cell* 1999; 10(10): 3113–3123.

Bény JL & Von Der Weid PY. Hydrogen peroxide: An endogenous smooth muscle cell hyperpolarizing factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1991; 176(1): 378–384.

Bissoli NS, Medeiros ARS, Santos MCS, Busato VCW, Jarske RD, Abreu GR, Moysés MR, Andrade TU. Long-term treatment with supraphysiological doses of nandrolone decanoate reduces the sensitivity of Bezold-Jarisch reflex control



of heart rate and blood pressure. *Pharmacological research* 2009; 59(6): 379–384.

Blouin K, Boivin A, Tchernof A. Androgens and body fat distribution. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2008; 108(3-5): 272–280.

Bourghardt J, Wilhelmson ASK, Alexanderson C, De Gendt, K, Verhoeven G, Krettek A, Ohlsson C, Tivesten A. Androgen receptor-dependent and independent atheroprotection by testosterone in male mice. *Endocrinology* 2010; 151(11): 5428–5437.

Bucci M, Mirone V, Di Lorenzo A, Vellecco V, Roviezzo F, Brancaleone V, Ciro I, Cirino G. Hydrogen sulphide is involved in testosterone vascular effect. *European urology* 2009; 56(2): 378–383.

Cavieres V, Valdes K, Moreno B, Moore-Carrasco R, Gonzalez DR. Vascular hypercontractility and endothelial dysfunction before development of atherosclerosis in moderate dyslipidemia : role for nitric oxide and interleukin-6. *American Journal of Cardiovascular Disease* 2014; 4(3): 114–122.

Chang J, Musser JH, Mcgregor H. Phospholipase A2: Function and pharmacological regulation. *Biochemical Pharmacology* 1987; 36(15): 2429–2436.

Chataigneau T, Félétou M, Duhault J, Vanhoutte P M. Epoxyeicosatrienoic acids, potassium channel blockers and endothelium-dependent hyperpolarization in the guinea-pig carotid artery. *British journal of pharmacology* 1998; 123(3): 574–580.

Chauhan SD, Hobbs AJ, Ahluwalia A. C-type natriuretic peptide: new candidate for endothelium-derived hyperpolarising factor. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2004; 36(10): 1878–1881.

Chen G, Suzuki H, Weston AH. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *British journal of pharmacology* 1988; 95(4): 1165–1174.

Chen Y, Fu L, Han Y, Teng Y, Sun J, Xie R, Cao J. et al. Testosterone replacement therapy promotes angiogenesis after acute myocardial infarction by enhancing expression of cytokines HIF-1a, SDF-1a and VEGF. *European journal of pharmacology* 2012; 684(1-3): 116–124.

Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *The Journal of clinical investigation* 1999; 103(3): 401–406.

Claessens F, Verrijdt G, Schoenmakers E, Haelens A, Peeters B, Verhoeven G, Rombauts W. Selective DNA binding by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific gene regulation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2001; 76(1-5): 23–30.

Claudio ERG, Endlich PW, Santos RL, Moysés MR, Bissoli NS, Gouvêa AS, Silva JF, Lemos VS, Abreu GR. Effects of chronic swimming training and oestrogen therapy on coronary vascular reactivity and expression of antioxidant enzymes in ovariectomized rats. *PloS one* 2013; 8(6): 01–08.

Deenadayalu V, Puttabyatappa Y, Liu AT, Stallone JN, White RE. Testosterone-induced relaxation of coronary arteries: activation of BKCa channels via the cGMP-dependent protein kinase. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 2012; 302(1): H115–123.

De Mey JG, Claeys M, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent inhibitory effects of acetylcholine, adenosine triphosphate, thrombin and arachidonic acid in the canine femoral artery. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1982; 222(1): 166–173.

Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annual review of pharmacology and toxicology* 2006; 46: 235–276.

Edwards G, Dora KAGardener MJ, Garland CJ, Weston AH. K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 1998; 396(6708): 269–272.

Eisermann K, Broderick CJ, Bazarov A, Moazam MM, Fraizer GC. Androgen up-regulates vascular endothelial growth factor expression in prostate cancer cells via an Sp1 binding site. *Molecular cancer* 2013; 12(7); 1–12.

Evans NA. Gym and tonic: a profile of 100 male steroid users. *British journal of sports medicine* 1997; 31(1): 54–85.

Evans NA. Current Concepts in Anabolic-Androgenic Steroids. *American Journal of Sports Medicine* 2004; 32(2): 534–542.

Fadini GP, Albiero M, Cignarella A, Bolego C, Pinna C, Boscaro E, Pagnin E, De Toni R, Kreutzenberg S, Agostini C, Avogaro A. Effects of androgens on endothelial progenitor cells in vitro and in vivo. *Clinical science (London, England : 1979)* 2009; 117(10): 355–364.

Farhat MY, Lavigne MC, Ramwell PW. The vascular protective effects of estrogen. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1996; 10(5): 615–624.

Féletou M & Vanhoutte PM. EDHF: new therapeutic targets? *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 2004; 49(6): 565–580.

Féletou M & Vanhoutte PM. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Where Are We Now? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2006; 26(6): 1215–1225.

Fischer M, Baessler A, Schunkert H. Renin angiotensin system and gender differences in the cardiovascular system. *Cardiovascular research* 2002; 53(3): 672–677.

Flammer AJ & Lüscher TF. Human endothelial dysfunction: EDRFs. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 2010; 459(6): 1005–1013.

Fleming I & Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 2003; 284(1): R1–12.

Foradori CD, Weiser MJ, Handa RJ. Non-genomic actions of androgens. *Frontiers in neuroendocrinology* 2008; 29(2): 169–181.

Formoso G, Chen H, Kim J, Montagnani M, Consoli A, Quon MJ. Dehydroepiandrosterone mimics acute actions of insulin to stimulate production of both nitric oxide and endothelin 1 via distinct phosphatidylinositol 3-kinase- and mitogen-activated protein kinase-dependent pathways in vascular endothelium. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 2006; 20(5): 1153–1163.

Förstermann U, Nakane M, Tracey WR, Pollock JS. Isoforms of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system. *European heart journal* 1993; 14 Suppl I: 10–15.

Förstermann, U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 2010; 459(6): 923–939.

Fortunati, N. Sex hormone-binding globulin: not only a transport protein. What news is around the corner? *Journal of endocrinological investigation* 1999; 22(3): 223–234.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clinical Chemistry* 1972; 18(6): 499–502.

Furchgott RF & Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288(5789): 373–376.

Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The Pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *The New England Journal of Medicine* 1992; 326: 310–318.

Gomes HL, Graceli JB, Gonçalves WLS, Santos RL, Abreu GR, Bissoli NS, Pires JGP, Cicilini MA, Moysés MR. Influence of gender and estrous cycle on plasma and renal catecholamine levels in rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 2012; 90(1): 75–82.

Griffith TM. Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis? *British journal of pharmacology* 2004; 141(6): 881–903.

Grober ED. Testosterone deficiency and replacement: Myths and realities. *Canadian Urological Association journal* 2014; 8(7-8 Suppl 5): S145–147.

Gupta S, McArthur C, Grady C, Ruderman NB. Role of endothelium-derived nitric oxide in stimulation of Na(+)-K(+)-ATPase activity by endothelin in rabbit aorta. *The American journal of physiology* 1994; 266(2 Pt 2): H577–582.

Hak AE, Witteman JCM, Frank H, Hofman A, Pols HAP. Low Levels of Endogenous Androgens Increase the Risk of Atherosclerosis in Elderly Men: The Rotterdam Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2002; 87(8): 3632–3639.

Heemers HV, Verhoeven G, Swinnen JV. Androgen activation of the sterol regulatory element-binding protein pathway: Current insights. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.) 2006; 20(10): 2265–2277.

Heinlein CA & Chang C. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Molecular endocrinology* 2002; 16(10): 2181–2187.

Herman SM, Robinson JT, McCredie RJ, Adams MR, Boyer MJ, Celermajer DS. Androgen deprivation is associated with enhanced endothelium-dependent dilatation in adult men. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 1997; 17(10): 2004–2009.

Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2003; 23(7): 1185–1189.

Hryb DJ, Khan MS, Rosner W. Testosterone-estradiol-binding globulin binds to human prostatic cell membranes. *Biochemical and biophysical research communications* 1985; 128(1): 432–440.

Iellamo F, Volterrani M, Caminiti G, Karam R, Massaro R, Fini M, Collins P, Rosano GMC. Testosterone therapy in women with chronic heart failure: a pilot double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Journal of the American College of Cardiology* 2010; 56(16): 1310–1316.

Jéquier E & Tappy L. Regulation of Body Weight in Humans. *Physiological Reviews* 1999; 79(2): 451–481.

Jones RD, Pugh PJ, Jones TH, Channer KS. The vasodilatory action of testosterone: a potassium-channel opening or a calcium antagonistic action? *British journal of pharmacology* 2003; 138: 733–744.

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

Jones TH, Arver S, Behre HM, Buvat J, Meuleman E, Moncada I, Morales AM, Volterrani M, Yellowlees A, Howell JD, Channer KS. Testosterone replacement in hypogonadal men with type 2 diabetes and/or metabolic syndrome (the TIMES2 study). *Diabetes care* 2011; 34(4): 828–837.

Kang S-M, Jang Y, Kim J-Y, Chung N, Cho S-Y, Chae JS, Lee J-H. Effect of oral administration of testosterone on brachial arterial vasoreactivity in men with coronary artery disease. *The American Journal of Cardiology* 2002; 89(7): 862–864.

Konoplya EF & Popoff EH. Identification of the classical androgen receptor in male rat liver and prostate cell plasma membranes. *The International journal of biochemistry* 1992; 24(12): 1979–1983.

Krupenko SA, Krupenko NI, Danzo BJ. Interaction of sex hormone-binding globulin with plasma membranes from the rat epididymis and other tissues. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 1994; 51(1-2): 115–124.

Kukovetz WR, Holzmann S, Wurm A, Pösch G. Prostacyclin increases cAMP in coronary arteries. *Journal of cyclic nucleotide research* 1979; 5(6): 469–476.

Kutscher EC, Lund BC, Perry PJ. Anabolic steroids: a review for the clinician. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)* 2002; 32(5): 285–296.

Langfort J, Jagsz S, Dobrzyn P, Brzezinska Z, Klapcinska B, Galbo H, Gorski J. Testosterone affects hormone-sensitive lipase (HSL) activity and lipid metabolism in the left ventricle. *Biochemical and biophysical research communications* 2010; 399(4): 670–676.

Lee H-K, Lee JK, Cho B. The role of androgen in the adipose tissue of males. *The world journal of men's health* 2013; 31(2): 136–140.

Lee YF, Shyr CR, Thin TH, Lin WJ, Chang, C. Convergence of two repressors through heterodimer formation of androgen receptor and testicular orphan receptor-4: a unique signaling pathway in the steroid receptor superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96(26): 14724–14729.

Li J & Al-Azzawi F. Mechanism of androgen receptor action. *Maturitas* 2009; 63(2): 142–148.

Liu D & Dillon JS. Dehydroepiandrosterone stimulates nitric oxide release in vascular endothelial cells: evidence for a cell surface receptor. *Steroids* 2004; 69(4): 279–289.

Liu PY, Death AK, Handelsman DJ. Androgens and cardiovascular disease. *Endocrine reviews* 2003; 24(3): 313–340.

Lu Y-L, Kuang L, Zhu H, Wu H, Wang X-F, Pang Y-P, Wang N-J, Yu D-L. Changes in aortic endothelium ultrastructure in male rats following castration, replacement with testosterone and administration of 5 $\alpha$ -reductase inhibitor. *Asian journal of andrology* 2007; 9(6): 843–847.

Lüscher TF & Barton M. Biology of the endothelium. *Clinical cardiology* 1997; 20(11 Suppl 2): II–3–10.

Malkin CJ, Jones RD, Jones TH, Channer KS. Effect of testosterone on ex vivo vascular reactivity in man. *Clinical science (London, England: 1979)* 2006; 111(4): 265–274.

Mangelsdorf DJ & Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 1995; 83(6): 841–850.



Marin R, Escrig A, Abreu P, Mas M. Androgen-dependent nitric oxide release in rat penis correlates with levels of constitutive nitric oxide synthase isoenzymes. *Biology of reproduction* 1999; 61(4): 1012–1016.

Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *The Journal of clinical investigation* 2000; 106(12): 1521–1530.

McCredie RJ, McCrohon JA, Turner L, Griffiths KA, Handelsman DJ, Celermajer DS. Vascular reactivity is impaired in genetic females taking high-dose androgens. *Journal of the American College of Cardiology* 1998; 32(5): 1331–1335.

Mead JR, Irvine SA, Ramji DP. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *Journal of molecular medicine* 2002; 80(12): 753–769.

Melchert RB & Welder AA. Cardiovascular effects of androgenic-anabolic steroids. *Medicine and science in sports and exercise* 1995; 27(9): 1252–126.

Mendel CM. The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocrine reviews* 1989; 10(3): 232–274.

Meyrelles SS, Peotta VA, Pereira TMC, Vasquez EC. Endothelial dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. *Lipids in health and disease* 2011; 10(1): 01–18

Michel T & Vanhoutte PM. Cellular signaling and NO production. *European journal of physiology* 2010; 459(6): 807–816.

Mombouli JV, Illiano S, Nagao T, Scott-Burden, T, Vanhoutte PM. Potentiation of endothelium-dependent relaxations to bradykinin by angiotensin I converting enzyme inhibitors in canine coronary artery involves both endothelium-derived

relaxing and hyperpolarizing factors. *Circulation Research* 1992; 71(1): 137–144.

Montalcini T, Gorgone G, Gazzaruso C, Sesti G, Perticone F, Pujia A. Endogenous testosterone and endothelial function in postmenopausal women. *Coronary artery disease* 2007; 18(1): 9–13.

Montaño LM, Calixto E, Figueroa A, Flores-Soto E, Carbajal V, Perusquía M. Relaxation of androgens on rat thoracic aorta: testosterone concentration dependent agonist/antagonist L-type Ca<sup>2+</sup> channel activity, and 5beta-dihydrotestosterone restricted to L-type Ca<sup>2+</sup> channel blockade. *Endocrinology* 2008; 149(5): 2517–2526.

Morley JE, Charlton E, Patrick P, Kaiser FE, Cadeau P, McCready D, Perry HM. Validation of a screening questionnaire for androgen deficiency in aging males. *Metabolism: clinical and experimental* 2000; 49(9): 1239–1242.

Mosca L, Banka CL, Benjamin EJ, Berra K, Bushnell C, Dolor RJ, Ganiats TG, Gomes AS, Gornik HL, Gracia C, Gulati M, Haan CK, Judelson DR, Keenan N, Kelepouris E, Michos ED, Newby LK, Oparil S, Ouyang P, Oz MC, Petitti D, Pinn VW, Redberg RF, Scott R, Sherif K, Smith SC, Sopko G, Steinhorn RH, Stone NJ, Taubert KA, Todd BA, Urbina E, Wenger NK. Evidence-based guidelines for cardiovascular disease prevention in women: 2007 update. *Circulation* 2007; 115(11): 1481–1501.

Moysés MR, Barker LA & Cabral AM. Sex hormone modulation of serotonin-induced coronary vasodilation in isolated heart. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2001; 34(7): 949–958.

Murray CJ & Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349(9064): 1498–1504.

Nakhla AM, Leonard J, Hryb DJ, Rosner W. Sex hormone-binding globulin receptor signal transduction proceeds via a G protein. *Steroids* 1999; 64(3): 213–216.

Negro-Vilar A. Selective Androgen Receptor Modulators (SARMs): A Novel Approach to Androgen Therapy for the New Millennium. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1999; 84(10): 3459–3462.

O'Kane KP, Webb DJ, Collier JG, Vallance PJ. Local L-NG-monomethyl-arginine attenuates the vasodilator action of bradykinin in the human forearm. *British journal of clinical pharmacology* 1994; 38(4): 311–315.

Ohashi J, Sawada A, Nakajima S, Noda K, Takaki A, Shimokawa H. Mechanisms for Enhanced Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-Mediated Responses in Microvessels in Mice. *Circulation Journal* 2012; 76(7): 1768–1779.

Oliveira PWC, Sousa GJ, Caliman IF, Lamas AZ, Medeiros ARS, Andrade TU, Abreu GR, Figueiredo SG, Bissoli NS. Metformin ameliorates ovariectomy-induced vascular dysfunction in non-diabetic Wistar rats. *Clinical science (London, England : 1979)* 2014; 127(4): 265–275.

Ong PJL, Patrizi G, Chong WCF, Webb CM, Hayward CS, Collins P. Testosterone Enhances Flow-Mediated Brachial Artery Reactivity in Men With Coronary Artery Disease. *The American Journal of Cardiology* 2000; 85(99): 269–272.

Ozkor MA & Quyyumi AA. Endothelium-derived hyperpolarizing factor and vascular function. *Cardiology research and practice* 2011; 2011: 01–12.

Pacher L, Beckman JS, Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiological reviews* 2011; 87(1): 315–424.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327(6122): 524–526.

Parkinson AB & Evans NA. Anabolic androgenic steroids: a survey of 500 users. *Medicine and science in sports and exercise* 2006; 38(4): 644–651.

Pärssinen M & Seppälä T. Steroid use and long-term health risks in former athletes. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)* 2002; 32(2): 83–94.

Peach J. Renin-Angiotensin System : Biochemistry and Mechanisms of Action. *Physiological Reviews* 1977; 57(2): 313–370.

Pergola G, Pannacciulli N, Ciccone M, Tartagni M, Rizzon P, Giorgino R. Free testosterone plasma levels are negatively associated with the intima-media thickness of the common carotid artery in overweight and obese glucose-tolerant young adult men. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 2003; 27(7): 803–807.

Perusquía M & Stallone JN. Do androgens play a beneficial role in the regulation of vascular tone? *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 2012; 298: H1301–1307.

Peskin AV & Winterbourn CC. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2000; 293(1-2): 157–166.

Popp R, Brandes RP, Ott G, Busse R, Fleming I. Dynamic modulation of interendothelial gap junctional communication by 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. *Circulation research* 2002; 90(7): 800–806.

Puttabyatappa Y, Stallone JN, Ergul A, El-Remessy, AB, Kumar S, Black S, - Johnson M, Owen MP, White RE. Peroxynitrite mediates testosterone-induced

vasodilation of microvascular resistance vessels. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2013; 345(1): 7–14.

Ramirez ME, McMurry MP, Wiebke GA, Felten KJ, Ren K, Meikle A W. Evidence for Sex Steroid Inhibition of Lipoprotein Lipase in Men: Comparison of Abdominal and Femoral Adipose Tissue. *Metabolism* 1997; 46(2): 179–185.

Ramírez-Rosas MB, Cobos-Puc LE, Muñoz-Islas E, González-Hernández A, Sánchez-López A, Villalón CM, Maassenvandenbrink A, Centurión D. Pharmacological evidence that Ca<sup>2+</sup> channels and, to a lesser extent, K<sup>+</sup> channels mediate the relaxation of testosterone in the canine basilar artery. *Steroids* 2011; 76(4): 409–415.

Randall MD & Kendall DA. Involvement of a cannabinoid in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated coronary vasorelaxation. *European Journal of Pharmacology* 1997; 335(2-3): 205–209.

Randall MD & Kendall DA. Anandamide and endothelium-derived hyperpolarizing factor act via a common vasorelaxant mechanism in rat mesentery. *European Journal of Pharmacology* 1998; 346(1): 51–53.

Rastogi A, Rashid M, Wright RF. Reducing Cardiorenal Risk Through Combination Therapy With a Direct Renin Inhibitor. *The Journal of Clinical Hypertension* 2011; 13(11): 848–855.

Reckelhoff JF, Zhang H, Srivastava K, Granger JP. Gender Differences in Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats: Role of Androgens and Androgen Receptor. *Hypertension* 1999; 34(4): 920–923.

Reckelhoff JF, Zhang H, Srivastava K. Gender Differences in Development of Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats: Role of the Renin-Angiotensin System. *Hypertension* 2000; 35(1): 480–483.

Reid IA. Interactions between ANG II, sympathetic nervous system, and baroreceptor reflexes in regulation of blood pressure. *The American journal of physiology* 1992; 262: E763–778.

Reid IA. The renin-angiotensin system: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Advances in physiology education* 1998; 20(1): S236–245.

Rosner W, Hryb DJ, Khan MS, Nakhla AM, Romas NA. Androgen and estrogen signaling at the cell membrane via G-proteins and cyclic adenosine monophosphate. *Steroids* 1999; 64(1-2): 100–106.

Salt PJ. Inhibition of noradrenaline uptake 2 in the isolated rat heart by steroids, clonidine and methoxylated phenylethylamines. *European journal of pharmacology* 1972; 20(3): 329–340.

Santos RL, Abreu GR, Bissoli NS, Moysés MR. Endothelial mediators of 17 beta-estradiol-induced coronary vasodilation in the isolated rat heart. *Brazilian journal of medical and biological research* 2004; 37(4): 569–575.

Santos RL, Marin EB, Gonçalves WLS, Bissoli NS, Abreu GR, Moysés MR. Sex differences in the coronary vasodilation induced by 17  $\beta$ -oestradiol in the isolated perfused heart from spontaneously hypertensive rats. *Acta physiologica (Oxford, England)* 2010; 200(3): 203–210.

Santos RL, Silva FB, Ribeiro RF, Stefanon I. Sex hormones in the cardiovascular system. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* 2014; 18(2): 89–103.

Schrör K, Morinelli TA, Masuda A, Matsuda K, Mathur RS, Halushka PV. Testosterone treatment enhances thromboxane A2 mimetic induced coronary artery vasoconstriction in guinea pigs. *European journal of clinical investigation* 1994; 24(Suppl 1): 50–52.

Shifren JL, Davis SR, Moreau M, Waldbaum A, Bouchard C, DeRogatis L, Derzko C, Bearson P, Kakos N, O'Neill S, Levine S, Wekselman K, Buch A, Rodenberg C, Kroll R. Testosterone patch for the treatment of hypoactive sexual desire disorder in naturally menopausal women: results from the INTIMATE NM1 Study. *Menopause (New York, N.Y.)* 2006; 13(5): 770–779.

Shimokawa H. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *European journal of physiology* 2010; 459(6): 915–922.

Shores MM, Matsumoto AM, Sloan KL, Kivlahan DR. Low serum testosterone and mortality in male veterans. *Archives of internal medicine* 2006; 166(15): 1660–1665.

Sievers C, Klotsche J, Pieper L, Schneider HJ, März W, Wittchen HU, Stalla GK, Mantzoros C. Low testosterone levels predict all-cause mortality and cardiovascular events in women: a prospective cohort study in German primary care patients. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 2010; 163(4): 699–708.

Siiteri PK, Murai JT, Hammond GL, Nisker JA, Raymoure WJ, Kuhn RW. The serum transport of steroid hormones. *Recent progress in hormone research* 1982; 38: 457–510.

Skogastierna C, Hotzen M, Rane A, Ekström L. A supraphysiological dose of testosterone induces nitric oxide production and oxidative stress. *European journal of preventive cardiology* 2013; 21(8): 1049–1054.

Stamler J, Neaton JD, Wentworth DN. Blood pressure (systolic and diastolic) and risk of fatal coronary heart disease. *Hypertension* 1989; 13(5\_Suppl): I1–12.

Taylor HJ, Chaytor AT, Evans WH, Griffith TM. Inhibition of the gap junctional component of endothelium-dependent relaxations in rabbit iliac artery by 18- $\alpha$  glycyrrhetic acid. *British journal of pharmacology* 1998; 125(1): 1–3.

Teoh H, Quan A, Leung SW, Man RY. Differential effects of 17beta-estradiol and testosterone on the contractile responses of porcine coronary arteries. *British journal of pharmacology* 2000; 129(7): 1301–1308.

Tep-Areenan P, Kendall DA, Randall MD. Testosterone-induced vasorelaxation in the rat mesenteric arterial bed is mediated predominantly via potassium channels. *British journal of pharmacology* 2002; 135(3): 735–740.

Tomioka H, Hattori Y, Fukao M, Sato A, Liu M-Y, Sakuma I, Kitabatake A, Kanno M. Relaxation in different-sized rat blood vessels mediated by endothelium-derived hyperpolarizing factor: importance of processes mediating precontractions. *Journal of Vascular Research* 1999; 36(4): 311–320.

Toot JD, Reho JJ, Novak J, Dunphy G, Ely DL, Ramirez RJ. Testosterone increases myogenic reactivity of second-order mesenteric arteries in both defective and normal androgen receptor adult male rats. *Gender medicine* 2011; 8(1): 40–52.

Traish A, Abu-Zahra H, Guay A. The brain, the penis and steroid hormones: clinical correlates with endothelial dysfunction. *Current pharmaceutical design* 2008; 14(35): 3723–3736.

Traish AM. Adverse health effects of testosterone deficiency (TD) in men. *Steroids* 2014; 88: 106–116.

Traish AM & Galoosian A. Androgens modulate endothelial function and endothelial progenitor cells in erectile physiology. *Korean journal of urology* 2013; 54(11): 721–731.

Tsang S, Wu S, Liu J, Wong TM. Testosterone protects rat hearts against ischaemic insults by enhancing the effects of alpha(1)-adrenoceptor stimulation. *British journal of pharmacology* 2008; 153(4): 693–709.



Tsang S, Wong SSC, Wu S, Kravtsov GM, Wong TM. Testosterone-augmented contractile responses to alpha1- and beta1-adrenoceptor stimulation are associated with increased activities of RyR, SERCA, and NCX in the heart. *American journal of physiology. Cell physiology* 2009; 296(4): C766–782.

Vanhoutte PM. Vascular physiology: the end of the quest? *Nature* 1987; 327(6122): 459–460.

Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarizations: the history. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society* 2004; 49(6): 503–508.

Wang H & Eckel RH. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2009; 297(2): E271–288.

Wang X, Smith GI, Patterson BW, Reeds DN, Kampelman J, Magkos F, Mittendorfer B. Testosterone increases the muscle protein synthesis rate but does not affect very-low-density lipoprotein metabolism in obese premenopausal women. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 2012; 302(6): E740–746.

Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994; 91(11): 5212–5216.

Williams MRI, Dawood T, Ling S, Dai A, Lew R, Myles K, Funder JW, Sudhir K, Komesaroff PA. Dehydroepiandrosterone increases endothelial cell proliferation in vitro and improves endothelial function in vivo by mechanisms independent of androgen and estrogen receptors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2004; 89(9): 4708–4715.

Wilson CM & McPhaul MJ. A and B forms of the androgen receptor are present in human genital skin fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994; 91(4): 1234–1238.

Wilson CM & McPhaul MJ. A and B forms of the androgen receptor are expressed in a variety of human tissues. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1996; 120(1): 51–57.

Wu FCW & Von Eckardstein A. Androgens and coronary artery disease. *Endocrine reviews* 2003; 24(2): 183–217.

Xu XF, Pergola G, Björntorp P. Testosterone increases lipolysis and the number of beta-adrenoceptors in male rat adipocytes. *Endocrinology* 1991; 128(1): 379–382.

Xu X, Pergola G, Björntorp P. The effects of androgens on the regulation of lipolysis in adipose precursor cells. *Endocrinology* 1990; 126(2): 1229–1234.

Yu J, Akishita M, Eto M, Ogawa S, Son B-K, Kato S, Ouchi Y, Okabe T. Androgen receptor-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells: role of phosphatidylinositol 3-kinase/akt pathway. *Endocrinology* 2010; 151(4): 1822–1828.

Zhou P, Fu L, Pan Z, Ma D, Zhang Y, Qu F, Guo L, Cao J, Gao Q, Han Y. Testosterone deprivation by castration impairs expression of voltage-dependent potassium channels in rat aorta. *European journal of pharmacology* 2008; 593(1-3): 87–91.

Zitzmann M, Faber S, Nieschlag E. Association of specific symptoms and metabolic risks with serum testosterone in older men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2006; 91(11): 4335–4343.

Zygmunt PM, Edwards G, Weston AH, Larsson B, Högestätt ED. Involvement of voltage-dependent potassium channels in the EDHF-mediated relaxation of rat hepatic artery. *British journal of pharmacology* 1997; 121(1): 141–149.