

**EFEITOS DA TESTOSTERONA SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR DE
RATOS HIPERTENSOS**

LETICIA TINOCO GONÇALVES

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Vitória, Fevereiro de 2023

LETICIA TINOCO GONÇALVES

**EFEITOS DA TESTOSTERONA SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR DE
RATOS HIPERTENSOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Roger Lyrio dos Santos.

Vitória, Fevereiro de 2023



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

REGISTRO DE JULGAMENTO DA TESE DA CANDIDATA AO GRAU DE
DOUTORA PELO PPGCF/CCS/UFES

Nº. Matrícula do(a) Candidato(a): 2017241502

A Comissão Examinadora da Tese de Doutorado intitulada “**EFEITOS DA TESTOSTERONA SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR DE RATOS HIPERTENSOS**” apresentada e defendida publicamente por LETICIA TINOCO GONÇALVES, candidata ao Título de Doutora em Ciências Fisiológicas, recomendou, após apresentação da Tese, realizada no dia 15 de fevereiro de 2023, que a mesma seja (assinale um dos itens abaixo):

☐ Aprovada

☐ Reprovada

Vitória, 15 de fevereiro de 2023.

Profº. Dr. Roger Lyrio dos Santos, PPGCF-UFES, Orientador

Profª. Drª. Alessandra Simão Padilha, PPGCF-UFES, Membro Interno

Profº. Dr. Leonardo dos Santos, PPGCF-UFES, Membro Interno

Profª. Drª. - Daniella Bonaventura, UFMG, Membro Externo

Profª. Drª. - Graziela Scialanti Ceravolo, UEL, Membro Externo

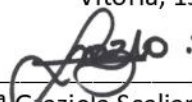


UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Ata da sessão de defesa de Tese do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, da discente **Leticia Tinoco Gonçalves**, candidata ao título de Doutora em Ciências Fisiológicas, realizada às 14:00h do décimo quinto dia do mês de fevereiro do ano dois mil e vinte e três, na Universidade Federal do Espírito Santo, de forma online. O presidente da Banca, Prof. Dr. Leticia Tinoco Gonçalves apresentou os demais membros da comissão examinadora, constituída pelos Doutores: Alessandra Simão Padilha (Ufes), Leonardo do Santos (Ufes), Daniella Bonaventura (UFMG) e Graziela Scialanti Ceravolo (UEL). Em seguida, cedeu a palavra à candidata que em 50 minutos apresentou sua Tese intitulada **“TESTOSTERONA SUPRAFISIOLÓGICA MODULA A VASODILATAÇÃO DEPENDE DO ENDOTÉLIO EM ARTÉRIAS DE RESISTÊNCIA DE RATOS HIPERTENSOS: PARTICIPAÇÃO DA DIHIDROTESTOSTERONA E DO ESTRADIOL”**. Terminada a apresentação da aluna, a presidente retomou a palavra e a cedeu aos membros da Comissão Examinadora, um a um, para procederem à arguição. A presidente convidou a Comissão Examinadora a se reunir em separado para deliberação. Ao final, a Comissão Examinadora retornou e a presidente informou aos presentes que a Tese havia sido aprovada e que a aluna deve providenciar dentro do período de 60 dias, a versão final da Tese. A Presidente, então, deu por encerrada a sessão, e eu, Jéssica Ribeiro da Silva, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, lavrei a presente ata, que é assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Vitória, 15 de fevereiro de 2023.

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



Profª Drª Graziela Scialanti Ceravolo
(UEL) – Titular externo

Prof. Dr. Leonardo do Santos
(PPGCF - Ufes) – Titular interno



Profª Drª Daniella Bonaventura
(UFMG) – Titular externo

Profª. Drª. Alessandra Simão Padilha
(PPGCF - Ufes) - Titular interno



Campus Universitário de Maruípe – Av. Marechal Campos, 1468 – Maruípe, Vitória – ES, 29043-900
Tel. (27)3335-7340 | cienciasfisiologicas.ufes.br | pos.cienciasfisiologicas@ufes.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
ALESSANDRA SIMAO PADILHA - SIAPE 2482917
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS
Em 27/02/2023 às 18:21

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/658294?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
LEONARDO DOS SANTOS - SIAPE 1803126
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS
Em 28/02/2023 às 14:50

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/658916?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
ROGER LYRIO DOS SANTOS - SIAPE 2531318
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS
Em 28/02/2023 às 20:08

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/659101?tipoArquivo=O>

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

G635e Gonçalves, Leticia Tinoco, 1990-
 EFEITOS DA TESTOSTERONA SOBRE A
 REATIVIDADE VASCULAR DE RATOS HIPERTENSOS /
 Leticia Tinoco Gonçalves. - 2023.
 120 f. : il.

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

 1. Testosterona. 2. Reatividade vascular. 3. Hipertensão. I.
 dos Santos, Roger Lyrio. II. Universidade Federal do Espírito
 Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 612

**Dedico esse trabalho à minha
família, especialmente, à Beatriz.**

AGRADECIMENTOS

Ao chegar ao final desta trajetória, nada mais justo do que agradecer a todos que de alguma maneira participaram, torceram e ajudaram na elaboração deste trabalho de doutorado.

Primeiramente agradeço ao meu Deus, que me proporcionou a realização desse sonho, sonho esse que eu nem acreditava ser possível sonhar. Guiou meus passos e ao final de tantos anos de dedicação fez com que tudo se encaixasse;

Aos meus pais, José Marcos e Nizete por toda dedicação à minha formação pessoal e profissional. Por me aconselharem nos momentos mais difíceis. Pelas constantes vibrações perante minhas vitórias, por estarem sempre dispostos a me ajudar e por todo exemplo de superação;

À minha filha Beatriz, que chegou no meio do curso e mudou toda minha visão de mundo. Foi minha maior motivação e me trouxe ainda mais vontade de vencer;

Ao meu marido, Guilherme, por segurar a minha mão desde o primeiro período da faculdade (2009). Por vivenciar toda essa trajetória profissional com muito entusiasmo e com os melhores conselhos. Construimos nossa família enquanto acumulávamos nossos diplomas. Sempre juntos!

Ao meu irmão, Diego, pelo companheirismo, incentivo e amizade. A todos os familiares e amigos, que rezaram e torceram por mim;

Ao meu professor e orientador Roger Lyrio dos Santos, muito obrigada por acreditar que eu seria capaz de realizar esse projeto. Obrigada por compartilhar tanto conhecimento, pela paciência e por abrir as portas do seu laboratório. Guardarei com carinho a lembrança desses anos e tenho orgulho de ter sido sua aluna. Você faz parte de uma das etapas mais importantes da minha vida e este sonho se tornou realidade também graças a você!

Aos meus amigos do Laboratório de Estudos em Reatividade Vascular – LABERV: Wender, Nathalie, Tagana, Jessyca, Pollyana, Juan, Izabela, Jocimar e Priscila. Obrigada por tornarem esses anos mais leves. Por toda troca de experiências, discussões enriquecedoras, estudos, conselhos, além das angústias e alegrias compartilhadas. E a todos os alunos de iniciação científica que tanto me ajudaram. A todos os demais colegas do PPGCF, meus agradecimentos!

A minha querida amiga Débora Tacon, que esteve comigo em todos os momentos desse curso. Que se fez presente mesmo distante, por escutar meus áudios infinitos, por todos os conselhos e ajuda nesse período. Obrigada amiga, amo nossa amizade!

A todos os professores e profissionais técnicos do PPGCF pelo conhecimento compartilhado. E a UFES e a CAPES pelo suporte financeiro para execução deste projeto;

A todos os animais;

Àqueles que não foram citados, mas que direta ou indiretamente me ajudaram nesses anos, meus mais sinceros agradecimentos.

“Eu posso ir muito além de onde estou,
vou nas asas do Senhor,
o teu amor é o que me conduz”

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xx
RESUMO.....	xxii
ABSTRACT.....	xxiii
1. INTRODUÇÃO.....	25
2. OBJETIVOS.....	41
2.1. Objetivo Geral	41
2.2. Objetivos Específicos	41
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.1. Animais experimentais	44
3.2. Grupos experimentais	44
3.3. Procedimentos experimentais	45
3.3.1. Orquiectomia	45
3.3.2. Tratamento com testosterona.....	46
3.3.3. Tratamento com inibidor da enzima aromatase.....	47
3.3.4. Tratamento com inibidor da enzima 5 α -redutase	47
3.3.5. Avaliação não invasiva da pressão arterial.....	48
3.3.6. Dosagens sorológicas - perfil hormonal	48
3.3.7. Dados ponderais	49
3.3.8. Avaliação da reatividade vascular em artérias mesentéricas.....	49
3.3.9. Análise da produção de ânion superóxido.....	52
3.3.10. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	53
3.4. Análise estatística	54
4. RESULTADOS	56

4.1.	Parâmetros ponderais.....	56
4.2.	Concentrações séricas de testosterona	58
4.3.	Concentrações séricas de 17 β -estradiol.....	59
4.4.	Concentrações séricas de Dihidrotestosterona	60
4.5.	Pressão arterial.....	61
4.6.	Reatividade vascular de artérias mesentéricas de resistência	62
4.6.1.	Vasodilatação dependente do endotélio	62
4.6.2.	Mediadores endoteliais envolvidos na vasodilatação à acetilcolina.....	63
4.6.3.	Participação do óxido nítrico	64
4.6.4.	Participação dos prostanoídes.....	66
4.6.5.	Participação da hiperpolarização dependente do endotélio (EDH)	68
4.7.	Efeito dos tratamentos sobre o estresse oxidativo em artérias mesentéricas de resistência	76
4.8.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	77
5.	DISCUSSÃO	81
6.	CONCLUSÃO.....	91
7.	REFERÊNCIAS	93
	APÊNDICES.....	118

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Prevalência do uso de drogas para melhorar desempenho em atletas americanos e os principais agentes anabólicos, descritos pela Agência Mundial Antidoping (WADA) (Modificada de Pope *et al.*, 2014). 28

Figura 2: Desenho modificado de Ayaz & Howlett (2015) ilustrando as etapas da biossíntese de andrógenos (Ayaz & Howlett, 2015). 30

Figura 3. Fluxograma de atividades realizadas. 45

Figura 4. Esquema representativo das etapas da orquiectomia (Rouver, 2021). (A) Preparação do campo operatório, (B) incisão na linha média da bolsa testicular, (C) exposição do testículo, (D) ligadura em torno do cordão espermático. (E) remoção do testículo e (F) sutura da bolsa testicular. 46

Figura 5. Representação esquemática dos protocolos de reatividade vascular (Rouver, 2021). 52

Figura 6. Nível sérico de testosterona. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs SHAM; # $p < 0,05$ vs ORX...59

Figura 7. Nível sérico de 17 β -estradiol. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs SHAM. # $p < 0,05$ vs TTO. + $p < 0,05$ vs TTO+FIN. 60

Figura 8. Nível sérico de dihidrotestosterona. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs SHAM. # $p < 0,05$ vs TTO. & $p < 0,05$ vs TTO+ANA. 61

Figura 9. Curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de ratos hipertensos (A) grupos SHAM, TTO e ORX, (B) TTO, TTO+ANA e

TTO+FIN e (C) AAC. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs SHAM; # $p < 0,05$ vs TTO; & $p < 0,05$ vs TTO+ANA. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Para AAC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Número de ratos indicado entre parênteses. 63

Figura 10. Curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de SHR dos grupos estudados na presença ou ausência de L-NAME (300 μ M). (A) SHAM, (B) ORX, (C) TTO, (D) TTO+ANA, (E) TTO+FIN e (F) dAAC. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs ACh. dAAC na presença de L-NAME, * $p < 0,05$ vs SHAM. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Para dAAC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Número de ratos indicado entre parênteses. 65

Figura 11. Curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de SHR dos grupos SHAM, ORX, TTO, TTO+ANA e TTO+FIN na presença ou ausência de Indometacina (10 μ M). (A) SHAM, (B) ORX, (C) TTO, (D) TTO+ANA, (E) TTO+FIN e (F) dAAC. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs ACh. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Para dAAC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Número de ratos indicado entre parênteses. 67

Figura 12. Curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de SHR dos grupos SHAM e TTO, na presença ou ausência de NS398 (1 μ M). (A) SHAM, (B) TTO e (C) dAAC. dAAC na presença de NS398. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Para dAAC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Número de ratos indicado entre parênteses. 68

Figura 13. Curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de SHR dos grupos SHAM, ORX, TTO, TTO+ANA e TTO+FIN na presença (simultânea) ou ausência de L-NAME (100 μ M) e Indometacina (10 μ M). (A) SHAM, (B) ORX, (C) TTO, (D) TTO+ANA, (D) TTO+FIN e (C) dAAC. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs ACh. dAAC na presença de L-NAME e Indometacina, * $p < 0,05$ vs SHAM. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Para dAAC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Número de ratos indicado entre parênteses. 70

Figura 14. Curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de SHR dos grupos SHAM, ORX e TTO na presença ou ausência de Clotrimazol (0,75 μ M). (A) SHAM, (B) ORX, (C) TTO, (D) TTO+ANA, (D) TTO+FIN e (C) dAAC. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs ACh. dAAC na presença de Clotrimazol, * $p < 0,05$ vs SHAM. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Para dAAC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Número de ratos indicado entre parênteses. 71

Figura 15. Curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de SHR dos grupos SHAM, ORX e TTO na presença ou ausência de Clotrimazol, L-NAME e Indometacina. (A) SHAM, (B) ORX, (C) TTO, (D) TTO+ANA, (D) TTO+FIN e (C) dAAC. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs ACh. dAAC na presença de L-NAME, Indometacina e Clotrimazol, * $p < 0,05$ vs SHAM; # $p < 0,05$ vs TTO. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Para dAAC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Número de ratos indicado entre parênteses. 73

Figura 16. Curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de SHR dos grupos SHAM, ORX e TTO na presença ou ausência de Catalase

(1000 U/mL). (A) SHAM, (B) ORX, (C) TTO, (D) TTO+ANA, (D) TTO+FIN e (C) dAAC. dAAC na presença de Catalase. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs Controle; # $p < 0,05$ vs TEA. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Para dAAC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Número de ratos indicado entre parênteses. 74

Figura 17. Curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de SHR dos grupos SHAM, TTO e ORX na presença ou ausência de TEA (5 mM). (A) SHAM, (B) ORX, (C) TTO, (D) TTO+ANA, (D) TTO+FIN e (C) dAAC. dAAC na presença de TEA. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs Controle. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Para dAAC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Número de ratos indicado entre parênteses. 76

Figura 18. (A) Análise representativa da microscopia de fluorescência emitida por dihidroetídio (DHE) em artérias mesentéricas nos diferentes grupos e (B) e análise semi-quantitativa de $O_2^{\cdot-}$. Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA uma via e pós-teste de *Tukey*, $p < 0,05$ * vs SHAM; # vs TTO; & vs ORX; \$ vs TTO+ANA. 77

Figura 19. Microscopia eletrônica de varredura do endotélio de artérias mesentéricas de terceira ordem dos grupos propostos. Cada imagem foi obtida com 2500x de magnificação. 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores do peso corporal (g) dos animais estudados nos dias 0, 14 e 28...56

Tabela 2: Dados ponderais dos órgãos sexuais, hipófise e glândulas adrenais (mg/mm) dos grupos estudados. 57

Tabela 3: Dados ponderais dos coxins de gordura e demais órgãos (mg/mm) dos grupos estudados.....58

Tabela 4: Valores de pressão arterial sistólica e diastólica (mmHg) dos animais dos grupos estudados.....61

Tabela 5. Valores de Rmax obtidos das curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de SHR dos grupos estudados. 63

Tabela 6. Valores de Rmax obtidos das curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de SHR na presença de L-NAME.....66

Tabela 7. Valores de Rmax obtidos das curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de SHR na presença de Indometacina. 67

Tabela 8. Valores de Rmax obtidos das curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de SHR na presença de NS398.....68

Tabela 9. Valores de Rmax obtidos das curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de SHR na presença simultânea de L-NAME e Indometacina 70

Tabela 10. Valores de Rmax obtidos das curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de SHR na presença de Clotrimazol.....71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
μM	Micromolar
ACh	Acetilcolina
ANA	Anastrozol
ANOVA	Análise de variância
AAC	Área abaixo da curva
BK_{Ca}	Canal para potássio ativado por cálcio de alta condutância
CaM	Calmodulina
cAMP	3', 5'-monofosfato cíclico de adenosina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLOT	Clotrimazol
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
CYP	Citocromo P450
dAAC	Delta da área abaixo da curva
DAG	Diacylglicerol
DCVs	Doenças cardiovasculares
DHE	Dihidroetídio
DHT	Dihidrotestosterona
E2	17 β-estradiol
EDH	Hiperpolarização dependente do endotélio
EETs	Ácidos epoxieicosatrienóicos
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FIN	Finasterida
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
IK_{Ca}	Canal para potássio ativado por cálcio de condutância intermediária

INDO	Indometacina
L-NAME	N ^ω -nitro-L-Arginina Metil Éster
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MLV	Músculo liso vascular
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato
nM	Nanomolar
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
NOX	NADPH oxidase
O₂^{•-}	Ânion superóxido
ORX	Orquiectomizado
PE	Fenilefrina
PGI₂	Prostaciclina
PGs	Prostaglandinas
PPGCF	Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
s.c.	Subcutâneo
SHR	<i>Spontaneously Hypertensive Rats</i>
u.a	Unidades arbitrárias
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
TEA	Tetraetilamônio

RESUMO

O uso abusivo da testosterona é considerado um problema de saúde pública global, apresentando diversos efeitos adversos. No sistema cardiovascular, seus efeitos ainda são controversos, variando de ações protetoras a deletérias. Como a testosterona é um hormônio que pode ser convertido a 17 β -estradiol e a dihidrotestosterona (DHT), parte dos efeitos encontrados com dose suprafisiológica pode ser atribuído aos seus metabólitos. Por isso, investigamos a hipótese de que dose suprafisiológica de testosterona promova prejuízo na vasodilatação dependente do endotélio de artérias mesentéricas de resistência, bem como suas repercussões sobre o estresse oxidativo e pressão arterial (PA). Avaliamos também a participação de 17 β -estradiol e DHT nas respostas encontradas. Utilizamos ratos espontaneamente hipertensos (SHR, *Spontaneously hypertensive rats*), com 8 a 10 semanas de idade, distribuídos em 5 grupos: intactos (SHAM), orquiectomizados (ORX), intactos tratados com testosterona (TTO; 3 mg/Kg/dia/s.c.), intactos tratados com testosterona e anastrozol [inibidor da enzima aromatase (TTO+ANA; 0,1 mg/Kg/dia)] e intactos tratados com testosterona e finasterida [inibidor da enzima 5 α -redutase (TTO+FIN; 5 mg/Kg/dia)] por 4 semanas. A PA foi avaliada por pletismografia de cauda. Realizamos curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh, 0,1 nM - 10 μ M) em artérias mesentéricas em miógrafo de arame, na ausência e presença de inibidores farmacológicos. As concentrações de testosterona, 17 β -estradiol e dihidrotestosterona foram avaliadas. A presença de espécies reativas de oxigênio e a ultraestrutura do endotélio foram analisadas por fluorescência emitida ao dihidroetídio (DHE) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), respectivamente. Dados foram expressos como média $\pm$ EPM, e analisados por teste *t Student* ou ANOVA uma ou duas vias, seguida pelo *post hoc* de Tukey ($p < 0,05$). A orquiectomia reduziu as concentrações sanguíneas de testosterona, 17 β -estradiol e dihidrotestosterona, prejudicou a vasodilatação à ACh, aumentou o EO, alterou a morfologia endotelial sem alterar a PA. O tratamento com testosterona não prejudicou a vasodilatação à ACh comparada ao grupo SHAM, contudo alterou as vias endoteliais de relaxamento, com menor participação do NO e maior dos prostanoídes, possivelmente derivados da COX-1. Além disso, no grupo TTO maior foi a participação da hiperpolarização dependente do endotélio (EDH) comparado ao SHAM, indicando que os EETs, H₂O₂ e canais para K⁺ contribuíram para essa resposta vasodilatadora. No grupo TTO+ANA, a redução dos níveis de 17 β -estradiol não prejudicou a vasodilatação à ACh contudo, diminuiu a participação do óxido nítrico e prostanoídes, e aumentou a EDH e os níveis de O₂^{•-}, com alteração da morfologia endotelial. O TTO+FIN apresentou prejuízo na resposta vasodilatadora à ACh, com uma participação aumentada do NO e menor dos prostanoídes. Em relação a EDH, com diminuição da dihidrotestosterona, não houve aumento na participação dos EETs, H₂O₂ e dos canais para K⁺ comparado ao TTO. A DHT parece contribuir para a diminuição do NO e o estrogênio parece estimular a ação da via do NO e dos prostanoídes. Na redução de estrogênio, a testosterona manteve a vasodilatação endotelial por maior estímulo a EDH, com mais ação dos EETs, H₂O₂ e dos canais para K⁺, com maior formação de O₂^{•-}. Estes resultados podem contribuir para elucidação do papel modulador da testosterona sobre a função endotelial, mesmo em tratamento com dose suprafisiológica, além de mostrar a importância da presença do estrogênio para o sistema cardiovascular em situações de disfunção endotelial.

Palavras-chave: Hormônios sexuais masculinos, estrogênio, dihidrotestosterona, anastrozol, finasterida,

ABSTRACT

The abusive use of testosterone is considered a global public health problem, with several side effects. In the cardiovascular system, its effects are still controversial, ranging from protective to deleterious actions. Because testosterone is a hormone that can be converted to 17 β -estradiol and dihydrotestosterone (DHT), part of the effects found with supraphysiological doses can be attributed to its metabolites. Therefore, we investigated the hypothesis that a supraphysiological dose of testosterone impairs the endothelium-dependent vasodilation of mesenteric resistance arteries, as well as its repercussions on oxidative stress (OS) and blood pressure (BP). We also evaluated the participation of 17 β -estradiol and DHT in the responses found. We used Spontaneously Hypertensive Rats (SHR), aged 8 to 10 weeks, divided into 5 groups: intact (SHAM), orchiectomized (ORX), intact testosterone-treated (TTO; 3 mg/Kg/day/s.c.), intact treated with testosterone and anastrozole [aromatase enzyme inhibitor (TTO+ANA; 0.1 mg/Kg/day)] and intact treated with testosterone and finasteride [5 α -reductase enzyme inhibitor (TTO+FIN; 5 mg/Kg/day)] for 4 weeks. BP was assessed by tail cuff plethysmography. We performed concentration-response curves to acetylcholine (ACh, 0.1 nM - 10 μ M) in mesenteric arteries using a wire myograph, in the absence and presence of pharmacological inhibitors. Also testosterone, 17 β -estradiol and dihydrotestosterone concentrations were evaluated. Vascular detection of superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) and endothelium ultrastructure were analyzed by DHE and scanning electron microscopy (SEM), respectively. Data were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean, and analyzed by Student's t-test or one-way or two-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test ($p < 0.05$). Orchiectomy reduced levels of testosterone, 17 β -estradiol and dihydrotestosterone, impaired ACh vasodilation, increased OS, altered endothelial morphology without altering BP. Testosterone treatment did not impair ACh vasodilation compared to the SHAM group, however it altered the endothelial pathways of relaxation, with lesser participation of NO and greater participation of prostanoids, possibly derived from COX-1. In addition, in the TTO group, the participation of EDH was greater compared to SHAM, indicating that EETs, H_2O_2 and K^+ channels contributed to this vasodilator response. In the TTO+ANA group, the reduction in 17 β -estradiol levels did not impair ACh vasodilation, however, it decreased the participation of nitric oxide, prostanoids and increased EDH, and increased $O_2^{\bullet-}$ levels with alteration of endothelial morphology. TTO+FIN showed impairment in the vasodilator response to ACh, with an increased participation of NO and a lower participation of prostanoids. Regarding EDH, with a decrease in dihydrotestosterone, there was no increase in the participation of EETs, H_2O_2 and K^+ channels compared to TTO. DHT seems to contribute to the decrease of NO and estrogen seems to stimulate the action of the NO pathway and prostanoids. In estrogen reduction, testosterone maintains endothelial vasodilation by greater stimulation of EDH, with more action of EETs, H_2O_2 and K^+ channels, with greater formation of $O_2^{\bullet-}$. These results may contribute to the elucidation of the modulating role of testosterone on endothelial function, even in treatment with a supraphysiological dose, in addition to showing the importance of the presence of estrogen for the cardiovascular system in situations of endothelial dysfunction.

Keywords: Male sex hormones, estrogen, dihydrotestosterone, anastrozole, finasteride, hypertension.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A constante busca do homem pela fonte da juventude, pela melhora da força, da coragem e do desempenho físico é relatada desde a Antiguidade. Na mitologia grega, a castração ocorreu na primeira geração de deuses e acredita-se que eunucos (homens castrados) existiram no antigo Egito nos anos 800 a.C. (antes de Cristo) (Nieschlag & Nieschlag, 2014). O conhecimento sobre a importância dos órgãos sexuais e suas secreções é descrita desde os primeiros registros humanos, sendo utilizados como afrodisíacos e no tratamento da disfunção erétil, determinantes para força e coragem do homem (Nieschlag & Nieschlag, 2014). A remoção dos testículos era realizada em homens e animais por diversos motivos como: retirar o vigor masculino, gerar escravos obedientes, forma de punição, automutilação religiosa, por vingança, para tornar espécies de animais domésticos mais dóceis e também para preservar vozes agudas das crianças nos adultos (Handelsman, 2006; Nieschlag & Nieschlag, 2014; Nieschlag & Nieschlag, 2017; Nieschlag & Nieschlag, 2019).

Apesar de já conhecerem a importância dos testículos, as primeiras descrições da sua função endócrina e a ação dos seus hormônios em órgãos distantes só foram relatadas por Arnold Adolph Berthold (1803-1861) em 1849. Berthold, estudando galos, observou que o comportamento sexual e agressivo era diminuído após a castração, e utilizando injeções de extrato de testículos ou com a reposição do órgão castrado, o comportamento típico retornava, concluindo que as secreções advindas dos testículos eram essenciais para o comportamento masculino (Nieschlag & Nieschlag, 2017; Morgentaler & Traish, 2018).

Mesmo com descoberta de Berthold, o *boom* da organoterapia (tratamento com o consumo ou secreção do órgão) só ocorreu no final do século XIX com as

descrições de Charles-Édouard Brown-Séquard (1817-1894) (Nieschlag & Nieschlag, 2014; Nieschlag & Nieschlag, 2017). Em um experimento, o cientista de 72 anos, auto-injetava uma mistura de sangue e sêmen extraídos de testículos de cães e cobaias, e descreveu sinais de rejuvenescimento (Brown-Séquard, 1889). Provavelmente esse rejuvenescimento foi efeito placebo, pois hoje já sabemos que os testículos produzem a testosterona, mas não a armazenam, porém, esse extrato foi considerado um verdadeiro elixir na época e foi comercializado em todo o mundo (Cussons *et al.*, 2002; Nieschlag & Nieschlag, 2014; Tyagui *et al.*, 2017; Morgentaler & Traish, 2018).

Com o grande destaque para a função dos testículos, as maiores indústrias farmacêuticas se uniram e trocaram informações objetivando alcançarem a síntese total dos hormônios esteroides e assim, transformarem a organoterapia em uma reposição hormonal adequada (Gaudilliere, 2005; Nieschlag & Nieschlag, 2017; Morgentaler & Traish, 2018). Em 1931, Adolf Butenandt (1903-1995) isolou 15 mg de androsterona utilizando 15.000 litros de urina de policiais jovens de Berlin (Butenandt, 1931). Em 1935, 10 mg de uma substância androgênica considerada mais forte que a androsterona foi isolada a partir de 100 kg de testículos de touros por Ernest Lacqueur (1866-1947), denominando-a testosterona (Gaudilliere, 2005). Nesse mesmo ano, a síntese química da testosterona foi publicada, por Butenandt (Butenandt & Hanisch 1935), seguido por Leopold Ruzicka (1887-1976) (Ruzicka & Wettstein, 1935) marcando o início da farmacologia clínica, bioquímica moderna e os estudos da fisiologia reprodutiva masculina (Nieschlag & Nieschlag, 2017; Tyagui *et al.*, 2017; Morgentaler & Traish, 2018).

Em 1937, mais precisamente, dois anos após a descrição da sua síntese, a primeira testosterona comercializável tornou-se disponível no mercado (Deansley &

Parkers, 1937; Gaudilliere, 2005; Nieschlag & Nieschlag, 2017). Nesse mesmo ano, foi publicado o processo de aromatização, que é a conversão da testosterona em 17 β -estradiol (Steinach & Kun, 1937). Já a redução da testosterona em dihidrotestosterona pela 5 α -redutase, só foi descrita em 1968 (Bruchovsky & Wilson).

O uso da testosterona cresceu nas décadas seguintes e continua sendo um dos mais antigos fármacos comercializados ainda em uso clínico regular (Figura 1), sendo amplamente indicada para o tratamento do hipogonadismo masculino (Handelsman, 2006). A testosterona e seus derivados também são indicados para uso clínico no tratamento de outras condições como anemia acompanhada de insuficiência renal, queimaduras, caquexia, baixa estatura, endometriose, câncer, doenças crônicas, catabolismo muscular e infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (Basaria, Wahlstrom & Dobs, 2001; Gullet, Hebbar & Ziegler, 2010).

Nos anos 40, a testosterona começou a ser utilizada em massa, primeiro como arma de guerra, pelos soldados durante a Segunda Guerra Mundial e Guerra Fria, para aumentar a agressividade e no tratamento dos sobreviventes debilitados. Em seguida começou a se difundir para os atletas de elite e competidores esportistas. Contudo, este perfil de usuários foi alterado, a partir dos anos 80, sendo hoje utilizado por homens, mulheres, jovens, idosos, atletas e não atletas (Gaudilliere, 2005; Handelsman, 2006; Kanayama, Kaufman & Harrison, 2018a). Usuários buscam, principalmente, seus efeitos anabólicos, para aumento de massa e força muscular. Além disso, a utilizam em situações de disfunção sexual masculina, infertilidade, falta de libido, para estimular o apetite, crescimento peniano, crescimento em altura, para reverter sintomas da anemia e usada por transexuais (Handelsman, 2006; Kanayama, Hudson & Harrison, 2008; Basaria *et al.*, 2010; Sagoe, Andreassen & Pallesen, 2014a; Sagoe *et al.*, 2014b; Handelsman, 2015).

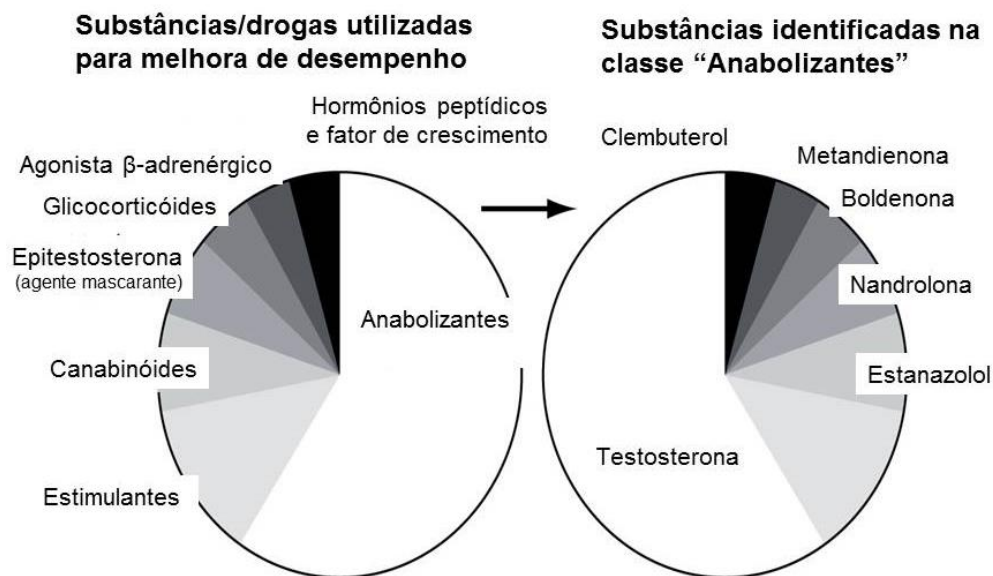


Figura 1: Prevalência do uso de drogas para melhorar desempenho em atletas americanos e os principais agentes anabólicos, descritos pela Agência Mundial Antidoping (WADA) (Modificada de Pope *et al.*, 2014).

A testosterona é o andrógeno mais importante e predominante nos homens, sendo atribuído a ela o papel do desenvolvimento dos tecidos reprodutivos masculinos, incluindo a atividade dos órgãos sexuais acessórios e as características sexuais secundárias. Em homens a síntese da testosterona é controlada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, sendo a secreção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) o elemento chave para o controle desse eixo (Schally *et al.*, 1971; Nieschlag & Nieschlag, 2017). Em situações fisiológicas, sinais neuroendócrinos do sistema nervoso central, especificamente no hipotálamo, estimulam a liberação pulsátil de GnRH, que ao se ligar aos receptores acoplados à proteína G nos gonadotrofos da adeno-hipófise, regulam a secreção do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo estimulante (FSH) (Naor, Harris & Shacham, 1998; Naor, 2009; Perret & Craig, 2013), que vão atuar em conjunto para regular a função gonadal. O LH estimula expressão gênica, atividade das enzimas

esteroidogênicas, e consequentemente, a secreção de testosterona, ao ligar-se a receptores acoplados à proteína G na membrana celular das células de Leydig. Já o FSH, estimula a espermiogênese. Além dos testículos, as glândulas adrenais são responsáveis por 5 % da secreção diária de testosterona (Mendelson, Dufau & Catt, 1975; Marsh, 1976; Dufau, 1998; Chen *et al.*, 2007; Herbison, 2016).

Níveis séricos elevados de testosterona promovem *feedback* negativo, que inibem a liberação de GnRH e LH. Já na queda dos níveis séricos de testosterona, a proteína reguladora aguda esteroidogênica (StAR), associada ao complexo multi-proteína, transporta o colesterol para a membrana mitocondrial interna nas células de Leydig (Figura 2) (Clark *et al.*, 1994). Uma vez que o colesterol atinge a membrana interna ocorre a clivagem de sua cadeia lateral pela enzima citocromo P450_{scc}, também conhecida como CYP11A1 (ou colesterol desmolase) transformando-o em pregnenolona. Esta por sua vez, difunde-se para o retículo endoplasmático onde a síntese de testosterona continua por meio das vias $\Delta 4$ e $\Delta 5$ (Miller, 1988; Miller & Auchus, 2011; Miller, 2013; Ayaz & Howlett 2015). Maior parte da biossíntese da testosterona, em testículos humanos, ocorre via $\Delta 5$, com secreção de 3 a 10 mg/dia (Fluck, Miller & Auchus, 2003; Sherbet, 2007).

Na via $\Delta 4$ a pregnenolona é convertida em progesterona pela 3β -hidroxiesteróide desidrogenase (HSD3 β), após esta etapa a enzima CYP17A1 a converte em 17α -hidroxiprogesterona e em seguida a androstenediona. A androstenediona forma a testosterona pela ação da 17β -hidroxiesteróide desidrogenase (HSD17 β 3). Na via $\Delta 5$ a enzima CYP17A1 converte pregnenolona primeiro em 17α -hidroxipregnenolona e em seguida, em dehidroepiandrosterona (DHEA). A DHEA é então convertida à androstenediona pela HSD3 β . Por último, a

HSD17 β 3 converte androstenediona em testosterona (Miller, 1988; Hanukoglu, 1992; Omura & Morohashi, 1995; Payne & Hales, 2004).

Principais vias gonadais para a biossíntese de hormônios esteróides

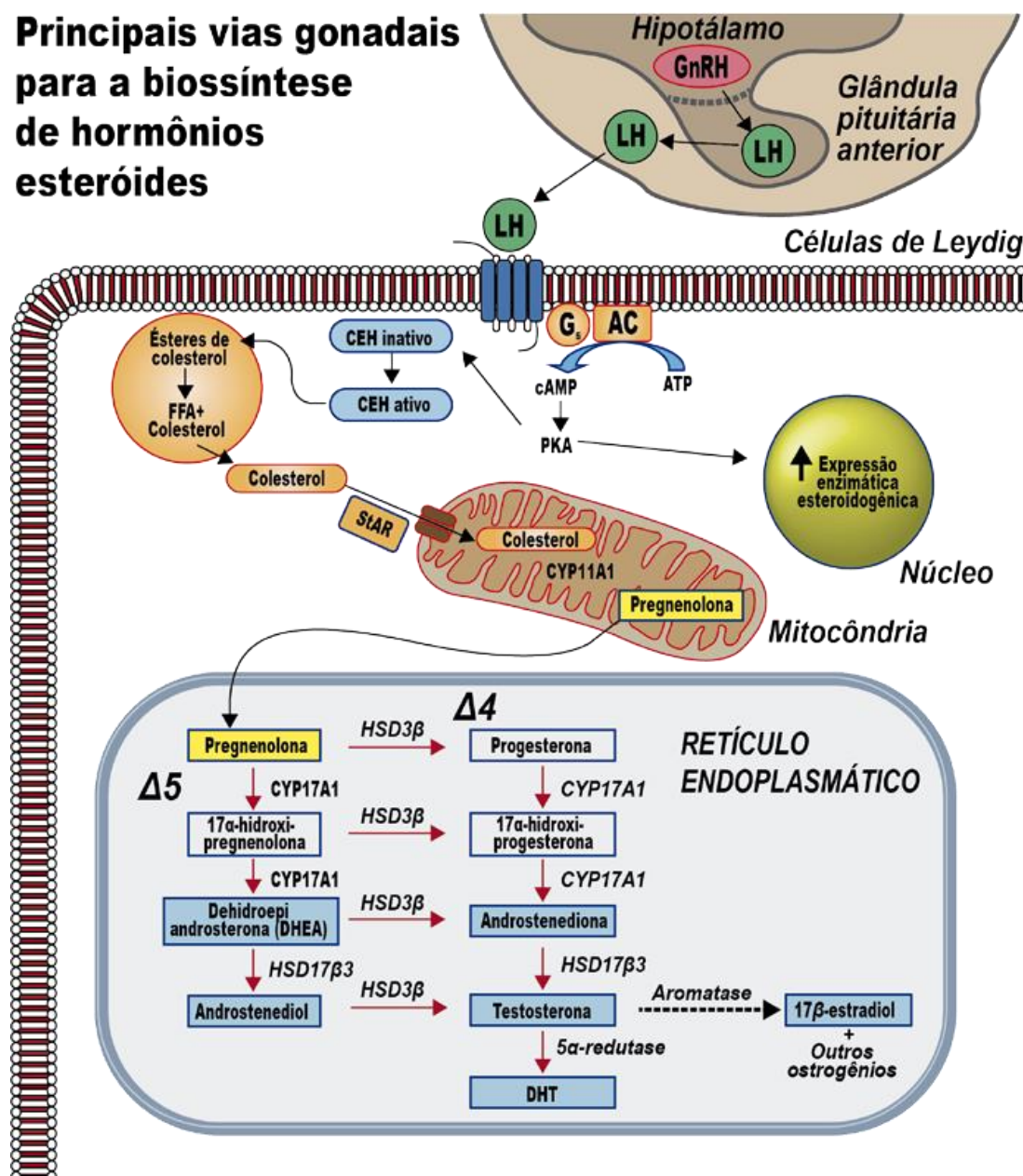


Figura 2: Desenho modificado de Ayaz & Howlett (2015) ilustrando as etapas da biossíntese de andrógenos (Ayaz & Howlett, 2015).

A testosterona circula no organismo na forma livre ou conjugada. Aproximadamente 44 % dela se encontra na corrente sanguínea ligada à globulina de

ligação de hormônios sexuais (*sex hormone binding globulin* - SHBG), 54 % ligada à albumina e de 2 a 3 % está sob a forma livre (biodisponível) (Pardridge, 1986; Hammond, Smith & Underhill, 1991; Hammond & Bocchinfuso, 1995; Tyagi *et al.*, 2017).

A testosterona pode ser convertida a 17 β -estradiol pela enzima aromatase (CYP19A1) da superfamília de enzimas citocromo P450, em áreas incluindo gônadas masculinas, tecido neural, adiposo, fígado e ossos (Simpson, Mahendroo & Means, 1994; Miller & Auchus, 2011; Stocco, 2012). Aproximadamente, 0,2 % da testosterona plasmática nos homens é convertida a estrogênio, sendo essencial para manutenção da libido e maturação espermática (Miller, 1988; Hess *et al.*, 1997; Sherbet, 2007). Além desta, 10 % da concentração plasmática de testosterona pode ser convertida a dihidrotestosterona (DHT), nos homens, um andrógeno mais potente pela ação das enzimas 5 α -redutase tipo 1 (codificada pelo gene SRD5A1, presente no couro cabeludo e em tecidos periféricos) e tipo 2 (SRD5A2, encontrada em tecidos reprodutivos masculinos) (Sherbet, 2007; Miller & Auchus, 2011; Schiffer *et al.*, 2018).

Apesar das décadas de uso clínico e dos benefícios conhecidos, o uso adequado da testosterona para terapia de reposição hormonal em distúrbios do sistema reprodutor masculino permanece em discussão constante. É difícil estimar a prevalência mundial do abuso de andrógenos, pois as pesquisas divergem nos resultados (Kanayama, Hudson & Harrison, 2008; Kanayama & Harrison, 2018b). O consumo é elevado em todo o mundo, sugerindo-se que apenas nos Estados Unidos mais de 3 milhões de pessoas utilizaram doses abusivas de andrógenos, sem indicação clínica válida, e possivelmente 1 milhão delas sofreram, em algum momento, com a dependência (Kanayama, Hudson & Harrison, 2008; Pope *et al.*, 2014). O uso

abusivo de testosterona, ou seja, sem indicação médica, inicia-se em média após os 18 anos de idade e aumentou 10 vezes na última década em homens com até 40 anos nos Estados Unidos (Baillargeon *et al.*, 2018). Em 80 % dos homens que utilizaram testosterona sem hipogonadismo patológico, o tratamento durou, em média, 30 dias ou menos (Baillargeon *et al.*, 2013). Geralmente, as doses de testosterona utilizadas variam de 600 a 1000 mg por semana, mas podem chegar a 5000 mg por semana, o que podem ser consideradas de 50 a 100 vezes maiores que a produção semanal fisiológica (Kanayama & Harrison, 2008).

A utilização indiscriminada é reflexo da disseminação de informações equivocadas pelos meios de comunicação e a busca por mudanças corporais, pela melhora da autoestima, da confiança e da concentração (Basaria *et al.*, 2010; Handelsman, 2011; Sagoe *et al.*, 2014b), além disso, pode estar associada a um distúrbio de imagem do indivíduo em relação a si próprio como a vigorexia (Pope, Katz & Hudson, 1993; Pope *et al.*, 1997). Apesar da crescente prevalência de abuso de andrógenos, seu uso subnotificado e clandestino gera limitações sistemáticas no estabelecimento de causa-efeito, com isso, a literatura sobre seus efeitos adversos é limitada. Os efeitos adversos podem acometer diversos sistemas orgânicos, incluindo efeitos cardiovasculares, psicológicos e reprodutivos (Kanayama, Kaufman & Harrison, 2018b). Dentre eles, destacam-se a atrofia testicular, ginecomastia, hipertensão arterial, arritmias letais, insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral, retenção de líquidos, lesões nos tendões, hemorragias nasais, resfriados frequentes, disfunção hepática e renal, irritabilidade, agressividade e irregularidades do sono (Korkia & Stimson, 1997; Reckelhoff, Zhang & Granger, 1998; Norton, Trifunovic & Woodiwis, 2000; Basaria, Wahlstrom & Dobs, 2001; Achar, Rostamian & Narayan, 2010; Pope *et al.*, 2014; Kauffman *et al.*, 2019).

Dentre os fatores relacionados ao uso abusivo, os efeitos anabólicos são bem conhecidos há décadas, o que tornou seu uso tão popular, porém a relação da testosterona com as doenças cardiovasculares até hoje é controversa. Como as doenças cardiovasculares (DCVs) fazem parte das principais causas de morte em todo o mundo, representando um grande problema de saúde pública (Burt *et al.*, 1995; Kearney *et al.*, 2005; Mosca *et al.*, 2011; Wong, 2017), cada vez mais busca-se identificar os efeitos, sejam eles maléficos ou não, dos andrógenos sobre esse sistema (Lane *et al.*, 2006).

Tradicionalmente, os andrógenos são relacionados à elevação do risco de DCV. Para alguns autores, a simples presença de níveis séricos mais elevados de testosterona seria por si só um fator de risco para DCVs em homens, e atribuíram ao sexo feminino ou a presença de hormônios sexuais femininos efeito cardioprotetor (Reckelhoff, 2001; Reckelholff, Zhang & Granger, 1998; Qiao, McConnell & Khalil, 2008). Esse fato se deve ao dimorfismo sexual presente nas DCVs, maior prevalência de DCVs acomete os homens entre 30 e 50 anos, após essa idade existe paridade de risco entre os sexos, e por volta da sétima década de vida maior é a prevalência nas mulheres. (Mosca *et al.*, 2011; Reckelhoff, 2018; Maranon & Reckelhoff, 2013; Armeni & Lambrinoudaki, 2017; Cho *et al.*, 2020). Um fator de risco importante para DCVs que parece ter relação com o sexo é a hipertensão arterial (Vasan *et al.* 2001).

De fato, os homens tipicamente apresentam maior pressão arterial (PA) do que as mulheres, e a capacidade da testosterona de induzir hipertensão em animais é conhecida há mais de 70 anos (Grollman, Harrison & Williams, 1940; Reckelholff, Zhang & Granger, 1998). Porém, já foi descrito que a hipotestoteronemia também pode provocar a hipertensão (Perusquía, Contreras & Herrera, 2019). A hipertensão é uma doença crônica multifatorial, que envolve múltiplos órgãos e sistemas e uma

complexa interação entre genética e meio ambiente. É caracterizada pela elevação sustentada dos níveis pressóricos, acima de 140 mmHg de pressão arterial sistólica e acima de 90 mmHg de pressão arterial diastólica (Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial, 2020).

Para o estudo da fisiopatologia, prevenção e tratamento da hipertensão o SHR (*Spontaneously hypertensive rats*) é o modelo mais utilizado. Este modelo é similar à hipertensão primária do homem (Okamoto & Aoki, 1963), que representa 95 % dos casos de hipertensão (Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial, 2020). Os SHRs apresentam alterações estruturais nos vasos sanguíneos logo após a primeira semana de vida, com diminuição do lúmen arterial, aumento da rigidez arterial, além do aumento da resposta contrátil, o que parece ser responsável pelo desenvolvimento da hipertensão (Folkwo *et al.*, 1970; Mulvany & Halpern, 1977; Lee *et al.*, 1983; Lee, 1985; Packer, 1994). Nos SHRs a elevação da pressão arterial ocorre a partir da 4ª semana de vida e a hipertensão é considerada instalada entre a 7ª e a 12ª semana de vida (Lee, 1985; Anishchenko *et al.*, 2015).

A hipertensão apresenta como mecanismo fisiopatológico a disfunção endotelial, que é caracterizada pelo desequilíbrio entre os fatores vasoativos, com predomínio dos fatores vasoconstritores (Schiffrin, Deng & Larochelle, 1993; Vanhoutte *et al.*, 2009; Kang, 2014), podendo levar ao desenvolvimento e progressão da aterosclerose, estimulando a agregação plaquetária, coagulação sanguínea e aumento de rigidez arterial (Stemerman *et al.*, 1981; Vanhoutte *et al.*, 2017). O endotélio, camada única de tecido epitelial, de revestimento simples, pavimentoso, localizada entre o sangue e o músculo liso vascular (Aird, 2007), regula o tônus vascular pela síntese e liberação de substâncias vasoativas (Furchgott & Zawadzki, 1980). Portanto, variações na função endotelial são consideradas um dos principais

fatores responsáveis pelo aumento e manutenção de níveis elevados de pressão arterial (Lüscher *et al.*, 1986; Taddei *et al.*, 1993).

Fatores vasodilatadores endoteliais incluem o óxido nítrico (NO) (Ignarro *et al.*, 1987; Palmer, Ashton & Moncada, 1988; Moncada, Palmer & Higgs, 1989), a prostaciclina (PGI₂) (Moncada *et al.*, 1976; Moncada, Higgs & Vane, 1977; Tateson, Moncada & Vane, 1977) e a hiperpolarização dependente do endotélio (EDH) (Félétou & Vanhoutte, 1988; Mombouli *et al.*, 1996). Já a endotelina-1 (Yanagisawa *et al.*, 1988; Yanagisawa & Masaki, 1989), a angiotensina II, os tromboxanos (Hamberg, Svensson & Samuelsson, 1975), as demais prostaglandinas (Hamberg, 1974) e as espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido (Gryglewski *et al.*, 1986; Guzik *et al.*, 2000), são descritos como fatores vasoconstritores.

O NO é considerado o principal fator responsável pela regulação do tônus vascular (Ignarro *et al.*, 1987). É derivado da L-arginina pela ação das enzimas óxido nítrico sintase (NOS) (Palmer, Ashton & Moncada, 1988; Moncada, Palmer & Riggs, 1989), sendo até o momento, descritas três isoformas, a NOS endotelial (eNOS), a NOS neuronal (nNOS) e a NOS induzível (iNOS). A eNOS e a nNOS são classificadas como constitutivas e são dependentes das concentrações intracelulares de cálcio para sua ativação, já a iNOS é induzida por estímulos inflamatórios e independe da concentração de cálcio (Förstermann *et al.*, 1994).

A PGI₂, principal prostanoide vasodilatador, é também um inibidor de agregação plaquetária, e é sintetizada nas células vasculares a partir do ácido araquidônico liberado dos fosfolípidos de membrana pela ação das enzimas ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) (Moncada, Higgs & Vane, 1977). A COX-1 é a isoforma constitutiva e a COX-2 é a induzível, responsável pelo aumento da produção de prostaciclina em algumas doenças (Castella-Lawson *et al.*, 1999; Morita, 2002).

Diferentemente do NO e da PGI₂, os fatores ou vias envolvidas na EDH variam de acordo com o tamanho e o tipo do vaso (Shimokawa *et al.*, 1996), bem como com as espécies estudadas. Dois exemplos são os ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Busse *et al.*, 2002; Shimokawa & Morikawa, 2005; Vanhoutte *et al.*, 2017).

Já está estabelecido que a testosterona pode modular a liberação de fatores vasoconstritores e vasodilatadores por mecanismos de ação genômica e não genômica. As ações não genômicas são associadas às respostas rápidas, comumente descritas em cultura de células, banhos de órgãos ou leitos vasculares isolados utilizando exposição aguda de testosterona, ou seja, incubação ou perfusão prévia com o hormônio (Jones *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2003; Cai *et al.*, 2016). Nesses modelos experimentais, as ações vasculares da testosterona são atribuídas à ligação a receptores acoplados a proteína G, localizados na membrana plasmática de células da musculatura lisa ou endotelial como o GPRC6A, já descrita em artérias mesentéricas (Harno *et al.*, 2008; Pi *et al.*, 2010; Pi; Parrill; Quarles, 2010) e o *transient receptor potential cation channel 8* da subfamília M (melastatina) (TRPM8) (Asuthkar *et al.*, 2015).

Após ligação com os receptores de membrana a testosterona pode promover a hiperpolarização do músculo liso vascular e vasodilatação, sem influenciar a expressão gênica, por alguns mecanismos: (1) Pela ação nos canais para potássio aumentando a sua probabilidade de abertura (Deenadayalu *et al.*, 2001; Tep-Areenan, Kendall & Randall, 2002; Kang *et al.*, 2003; Cairrão *et al.*, 2008; Deenadayalu *et al.*, 2012); (2) Por sua capacidade de modular a produção de NO, associada a expressão de eNOS e ativar a via de cGMP, e assim, promover o relaxamento da musculatura vascular (Yu *et al.*, 2010). (3) Em concentrações fisiológicas a testosterona pode atuar

como antagonista dos canais para Ca^{2+} e promover menor influxo de Ca^{2+} e consequente vasodilatação, mecanismo descrito em aorta (Costarella *et al.*, 1996; Honda, Unemoto & Kogo, 1999) e em artéria mesentérica de ratos (Tep-Areenan, Kendall & Randall, 2002; del Campo *et al.*, 2013; Puttabyatappa *et al.*, 2013), em artéria coronárias de cães (Perusquía *et al.*, 2012) e de porcos (Deenadayalu *et al.*, 2001; Deenadayalu *et al.*, 2012), em cultura de células endoteliais e musculares aórticas de ratos (Campelo, Cutini & Massheimer, 2012), em artéria umbilical humana (Cairrão *et al.*, 2008) e em artérias e veias pulmonares humanas (Smith *et al.*, 2008; Rowell *et al.*, 2009).

As ações vasculares da testosterona também ocorrem por mecanismos genômicos, por meio de receptores intracelulares para esse hormônio tanto no endotélio como no músculo liso vascular (Negro-Vilar, 1999; Liu; Death; Handelsman, 2006). Após ligação da testosterona com os receptores de andrógenos (ARs), ocorre nestes uma alteração conformacional com translocação para o núcleo celular, seguido de fosforilação e interação com os elementos responsivos para andrógenos, dando início a transcrição gênica que será seguida pelo processo de síntese proteica (Grino; Griffin; Wilson, 1990; Claessens *et al.*, 2001). Dessa forma, a ligação da testosterona com receptor de andrógeno intracelular pode induzir ou reprimir genes específicos e modular os efeitos fisiológicos, regulando a síntese, a liberação e a ativação de fatores locais relacionados ao controle do tônus vascular (Heinlein & Chang, 2002; Kang *et al.*, 2003).

Ações genômicas estão relacionadas a efeitos a longo prazo e os modelos experimentais que melhor representam esses resultados são os estudos envolvendo orquiectomia (remoção cirúrgica dos testículos) ou tratamento hormonal dos animais com testosterona. Nesses modelos experimentais, a diminuição na concentração de

testosterona (orquiectomia) foi relacionada à disfunção endotelial com diminuição da biodisponibilidade de NO em artéria mesentérica de ratos (Blanco-Riveiro, Balfagon & Ferrer, 2005; del Campo *et al.*, 2014). Em nosso laboratório já demonstramos prejuízo na vasodilatação dependente do endotélio em leito vascular coronariano, após orquiectomia, e o tratamento com dose fisiológica de testosterona reverteu esse prejuízo (ROUVER *et al.*, 2015). O tratamento com doses fisiológicas pode melhorar o dano vascular causado pela orquiectomia via ativação da via de sinalização PI3K/AKT, já descrito em aorta torácica de ratos (Zhao *et al.*, 2016).

Contudo, diversos efeitos vasculares deletérios da testosterona também são descritos. Animais tratados com altas doses de testosterona apresentam lesão vascular (Zhao *et al.*, 2016) e desenvolvem hipertensão com redução do relaxamento mediado pela EDH em artérias mesentéricas de ratos (More *et al.*, 2015) e ratas (Mishra *et al.*, 2017). O aumento na concentração de testosterona está associado à disfunção endotelial pela redução da biodisponibilidade de NO, PGI₂ e na EDH, bem como aumento do estresse oxidativo, resultando em menor relaxamento dependente do endotélio e aumento da vasoconstrição (Toot *et al.*, 2011; Lane *et al.*, 2006; Caliman *et al.*, 2017; Guzzoni *et al.*, 2018). Além disso, a orquiectomia em SHRs (ou seja, na presença de DCVs), diminui a pressão arterial, assim, relacionando a redução de testosterona aos benefícios cardiovasculares (Martin *et al.*, 2005; Tatchum-Talom *et al.*, 2011).

Como descrito até então, o conhecimento na literatura continua inconclusivo sobre a ação da testosterona no ambiente vascular. Nossa hipótese é que doses suprafisiológicas de testosterona promovam um prejuízo na vasodilatação endotelial com aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e da pressão arterial. Nesse contexto o presente estudo propõe, a investigação dos efeitos de dose

suprafisiológica de testosterona sobre a reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência isoladas, na presença de DCVs, as quais têm importante participação no processo de reatividade vascular e regulação da pressão arterial.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do tratamento com dose suprafisiológica de testosterona, sobre a reatividade vascular e estresse oxidativo em artérias mesentéricas de resistência de ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a capacidade de relaxamento induzido pela acetilcolina em artérias mesentéricas de resistência de ratos tratados com dose suprafisiológica de testosterona;
- Identificar a participação do 17 β -estradiol e da dihidrotestosterona no tratamento com dose suprafisiológica de testosterona;
- Investigar a participação de mediadores endoteliais de relaxamento no relaxamento dependente de endotélio em artérias mesentéricas de SHR tratados com dose suprafisiológica de testosterona.
- Avaliar composição corporal dos animais antes e após tratamento com dose suprafisiológica de testosterona;
- Verificar possíveis alterações de pressão arterial nos animais espontaneamente hipertensos;
- Quantificar os níveis sanguíneos de testosterona, 17 β -estradiol e dihidrotestosterona em ratos tratados com dose suprafisiológica de testosterona;
- Verificar a presença de espécies reativas de oxigênio em artérias mesentéricas de SHR tratados com dose suprafisiológica de testosterona;

- Analisar a morfologia endotelial e possíveis alterações após tratamentos com dose suprafisiológica de testosterona em SHR.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais experimentais

Para este estudo foram utilizados ratos SHR (*Spontaneously hypertensive rats*) machos, com 8 a 10 semanas de idade. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA (CONCEA-MCT, 2016) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFES (#04/2018).

Todos os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (máximo de 5 animais por gaiola), com livre acesso à água e à ração (Purina Labina, SP - Brasil), em sala com temperatura (22 ± 2 °C) e umidade relativa do ar (45 % a 65 %) controladas. O ciclo de luz foi regulado para períodos de 12/12 horas, alternando-se entre claro e escuro.

3.2. Grupos experimentais

Os animais foram aleatoriamente separados em cinco diferentes grupos experimentais:

- SHAM: Controle;
- ORX: Castrado;
- TTO: Tratamento com dose suprafisiológica de testosterona;
- TTO+ANA: TTO + Tratamento com inibidor da aromatase (P450) (anastrozol).
- TTO+FIN: TTO + Tratamento com inibidor da 5 α -redutase (finasterida).

3.3. Procedimentos experimentais

Para atingir os objetivos desse estudo, foram realizados os seguintes procedimentos experimentais:

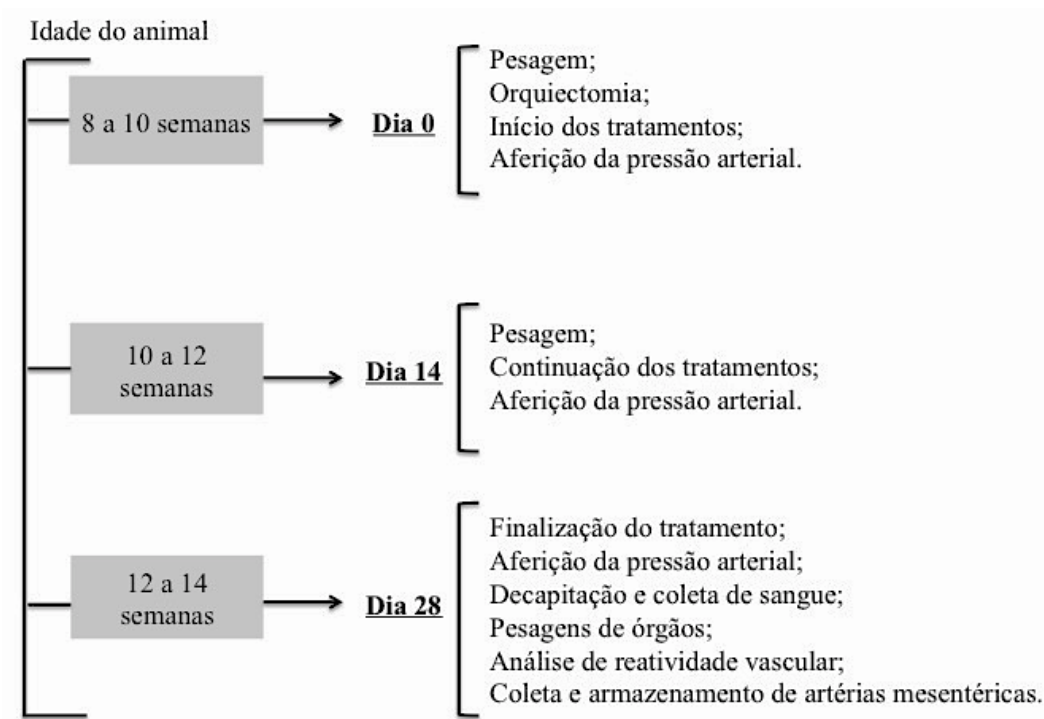


Figura 3. Fluxograma de atividades realizadas.

3.3.1. Orquiectomia

Para a realização do procedimento, o animal após ser anestesiado com a combinação de ketamina (70 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) via intraperitoneal, foi posicionado em decúbito dorsal e imobilizado com fita adesiva sobre uma prancha cirúrgica. Antes da incisão, foi realizada a desinfecção, da região da bolsa testicular, com álcool iodado. A cirurgia foi iniciada com uma incisão perpendicular de 0,5 a 1 cm na região da linha mediana da bolsa testicular e posterior exposição dos testículos por compressão. Posteriormente, foi realizada a abertura da túnica *vaginalis* e a ligadura dos testículos em torno do cordão espermático. Após a remoção dos testículos, a bolsa testicular foi suturada.

Os grupos SHAM, TTO, TTO+ANA e TTO+FIN foram submetidos a uma cirurgia fictícia, seguindo os mesmos procedimentos e em tempo equivalente, porém sem a ligadura e a retirada dos testículos.

Ao final da cirurgia, todos os animais receberam uma dose única de antibiótico (Enrofloxacina - 2,5 % - 0,1 mL, i.m.), para prevenir possíveis infecções, e de analgésico (Dipirona – 10 mg/kg).

A eficácia da orquiectomia e dos tratamentos foram avaliadas pela pesagem dos órgãos sexuais, corrigidos pelo comprimento da tíbia. Outro parâmetro biométrico avaliado e que auxilia na validação do método de castração (além dos órgãos sexuais), foi a pesagem dos órgãos integrantes do eixo hipotálamo-hipófise-adrenais.

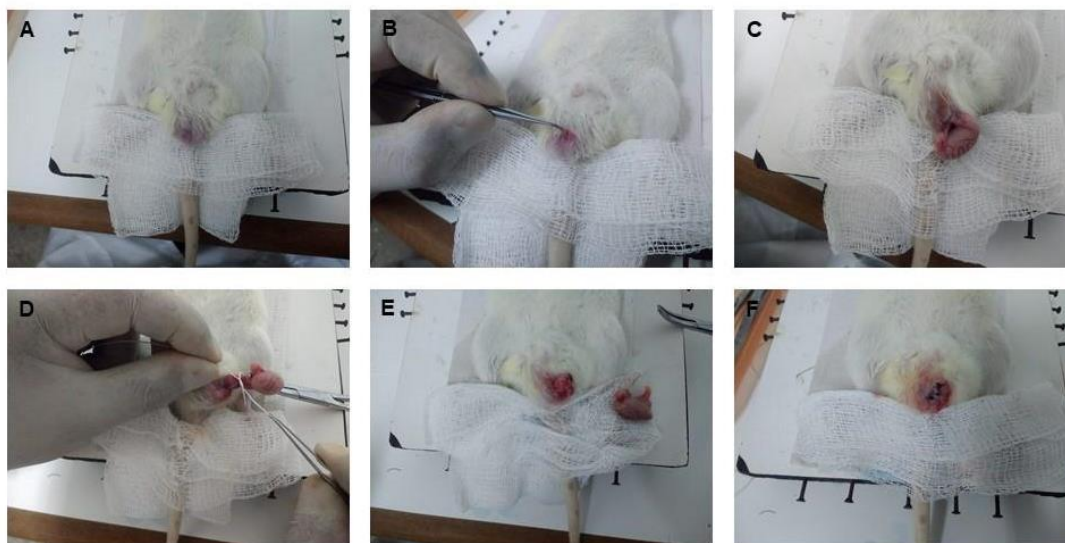


Figura 4. Esquema representativo das etapas da orquiectomia (Rouver, 2021). (A) Preparação do campo operatório, (B) incisão na linha média da bolsa testicular, (C) exposição do testículo, (D) ligadura em torno do cordão espermático. (E) remoção do testículo e (F) sutura da bolsa testicular.

3.3.2. Tratamento com testosterona

No mesmo dia da cirurgia fictícia, foi iniciado o tratamento com testosterona (Testosterona Bioidêntica – IMAFAR), com duração de quatro semanas. Foi utilizada a via subcutânea para administração da testosterona diluída em 0,1 mL de óleo de

girassol (veículo). Para os grupos TTO, TTO+ANA e TTO+FIN, foi administrada uma dose de 3,0 mg/Kg/dia, dose 6 vezes maior que a dose utilizada para tratamento fisiológico (0,5 mg/kg/dia) (Moysés, Backer & Cabral, 2001; Rouver *et al.*, 2015; Ribeiro Junior *et al.*, 2018). Os grupos SHAM e ORX receberam o mesmo volume dos grupos anteriores, porém contendo apenas o veículo.

3.3.3. Tratamento com inibidor da enzima aromatase

Para avaliar o efeito da testosterona independente da sua conversão ao 17 β -estradiol, foi proposto o grupo TTO+ANA. Os animais receberam a dose de 0,1 mg/Kg/dia de anastrozol (Anastrozole – Cayman Chemical), inibidor da enzima aromatase (CYP19A1), diluída em 0,1 mL de solução salina, administrada via gavagem (Altintas *et al.*, 2010; Manigrasso *et al.*, 2012; Soljancic *et al.*, 2013) pelo tempo equivalente do tratamento da testosterona. O tratamento com testosterona foi realizado conforme item 3.3.2.

3.3.4. Tratamento com inibidor da enzima 5 α -redutase

O grupo TTO+FIN foi realizado para avaliar se os resultados obtidos eram referentes à testosterona ou ao seu metabólito mais ativo, a dihidrotestosterona. Para isso, os animais foram tratados com inibidor da enzima 5 α -redutase, a finasterida (Fendical – Finasterida - UciFarma), na dose de 5 mg/Kg/dia diluído em 0,4 mL de solução salina, administrado por via orogástrica (gavagem) (Gao *et al.*, 2004; Baig *et al.*, 2019; Kolasa-Wołoskiuk *et al.*, 2019) pelo tempo equivalente do tratamento da testosterona.

3.3.5. Avaliação não invasiva da pressão arterial

Para avaliação da pressão arterial dos animais, foi realizada a etapa de aclimação três dias antes do registro oficial. Esta etapa tem o objetivo de minimizar a influência do estresse sobre a pressão arterial e consiste no acondicionamento do animal por 10 minutos no equipamento.

No dia do registro os animais foram aquecidos em uma câmara de contenção com um *cuff* de pulso pneumático acoplado na região próxima a cauda. Um esfigmomanômetro foi insuflado e desinsuflado automaticamente e os valores de pressão arterial sistólica, diastólica, média e os batimentos por minuto foram coletados automaticamente usando um pletismógrafo acoplado a um computador. A temperatura foi controlada entre 35 °C e 37 °C durante o tempo que o animal permaneceu no equipamento. Foi obtida a média de, no mínimo, 5 registros com diferença máxima de 10 mmHg, sendo descartados os registros associados às influências causadas por movimentos dos animais.

3.3.6. Dosagens sorológicas - perfil hormonal

Ao final do tratamento, foram coletados 5 mL de amostras de sangue após a decapitação dos animais, para realização das dosagens sorológicas. Em seguida, o sangue foi centrifugado (Excelsa® IV Modelo 280r) a 02556 g (3500 rpm) por 15 minutos a 4 °C, o soro foi separado e estocado à -80 °C. Os níveis de testosterona foram quantificados utilizando imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência usando o teste Architect 2nd Generation Testosterone. O limite de detecção para testosterona era $\leq 0,15$ nmol/L. Os níveis de 17 β -estradiol foram quantificados por imunoensaio com o teste Architect, de limite de detecção de ≤ 5 pg/mL. Os níveis de dihidrotestosterona, por sua vez, foram avaliados por ensaio

imunoenzimático pelo teste Diagnostics Biochem Canada Inc., com limite de detecção de 17 pg/mL.

3.3.7. Dados ponderais

Todos os animais foram pesados antes da orquiectomia ou cirurgia fictícia. Após 14 dias de tratamento e a última pesagem foi realizada antes da eutanásia para o estudo funcional de reatividade vascular (com 28 dias de tratamento). Em seguida, alguns órgãos (testículo, vesícula seminal, epidídimo, rins, glândulas adrenais, fígado, pulmão, coração, ventrículo esquerdo, ventrículo direito, hipófise, músculo gastrocnêmio, gordura epididimal, gordura retroperitoneal e gordura perirrenal) foram dissecados, após exsanguinação e pesados em balança analítica (Shimadzu – AUY220) (Flickinger, 1978; Ma *et al.*, 2004; Jang *et al.*, 2010; Bringel *et al.*, 2011; Iamsaard *et al.*, 2014). Os pesos dos órgãos foram corrigidos pelo comprimento da tibia do respectivo rato e comparados entre os grupos.

3.3.8. Avaliação da reatividade vascular em artérias mesentéricas

Para estudar a reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência, foi utilizado o método descrito por Mulvany & Halpern (1977). Após eutanásia por decapitação, sem utilização de anestésicos, para evitar efeito depressor sobre a fase contrátil (Hatano *et al.*, 1989), artérias mesentéricas de terceira ordem foram identificadas, isoladas e dissecadas dos tecidos circundantes não vasculares. Os segmentos arteriais foram seccionados em anéis de 2 mm e dois fios de tungstênio (40 µm de diâmetro) foram inseridos no lúmen das artérias e montados em um miógrafo para vasos de resistência. As artérias foram mantidas em solução de Krebs (composição em mM): NaCl (119), KCl (4.7), KH₂PO₄ (0.4), NaHCO₃ (14.9),

MgSO₄.7H₂O (1.17), CaCl₂.2H₂O (2.5) e glicose (5.5) a 37 °C e gaseificada com mistura carbogênica (5 % CO₂ e 95 % O₂). Após a montagem dos anéis nas câmaras do miógrafo para vasos de resistência, a circunferência interna foi normalizada, para isso os seguimentos arteriais foram gradualmente estirados até que seus diâmetros internos correspondessem a uma pressão transmural de 100 mmHg (IC100), então a circunferência interna (IC1) foi normalizada para uma fração definida de IC100. Para tanto, o IC1 foi calculado a partir da multiplicação do IC100 por um fator (0,9) (SLEZÁK *et al.*, 2010), que permitisse ao segmento vascular máxima produção de força ativa, bem como a sensibilidade aos agonistas. Finalizada a normalização, os anéis foram mantidos por um período de estabilização de 60 minutos. A viabilidade e integridade de endotélio foram avaliadas pela administração de acetilcolina (ACh, 10µM) nas artérias previamente contraídas com fenilefrina (PE, 3 µM). Todos os anéis estudados apresentaram relaxamento maior que 80 % em resposta a ACh. Após novo período de estabilização de 30 minutos, foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas à acetilcolina (1 nM a 100 µM) para avaliar a resposta vasodilatadora das artérias mesentéricas de resistência nos diferentes grupos experimentais, após pré-contracção com fenilefrina (PE, 3 µM). Todas as respostas foram registradas por meio de um sistema de aquisição e análise informatizado, acoplado a transdutores isométricos Danish Myo-Technology (DMT, Dinamarca).

Para avaliar a participação de diferentes fatores vasodilatadores e canais possivelmente envolvidos na resposta à ACh nos diferentes grupos, nova curva de relaxamento a ACh foi realizada. Para isso, os anéis foram lavados e estabilizados por 15 minutos, em seguida os inibidores foram administrados e após 30 minutos a curva de relaxamento a ACh (1 nM a 100 µM) foi repetida. Os seguintes inibidores foram utilizados:

1) inibidor não seletivo NOS, o N^ω-nitro-L-Arginina Metil Éster (L-NAME, 300 µM), para analisar a participação do NO.

2) inibidor não seletivo COX, a indometacina (INDO; 10 µM), para avaliar a participação dos prostanoídes derivados da COX.

3) inibidor seletivo da COX-2, NS398 (1 µM), para avaliar a participação específica desta via.

4) inibição simultânea das enzimas NOS e COX, com L-NAME (300 µM) e INDO (10 µM), respectivamente, para avaliar a resposta vasodilatadora independente de NO e prostanoídes.

5) bloqueador não seletivo dos canais para potássio, tetraetilamônio (TEA, 5 mM).

6) inibição simultânea dos canais para potássio e das enzimas NOS e COX com tetraetilamônio (TEA, 5 mM), L-NAME (100 µM) e Indometacina (10 µM), respectivamente.

7) inibidor da enzima citocromo P450, clotrimazol (0,75 µM) para avaliar possível participação dos ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs).

8) inibição simultânea das enzimas NOS, COX e P450 com L-NAME (300 µM), Indometacina (10 µM) e clotrimazol (CLOT; 0,75 µM), respectivamente, para avaliar a resposta vasodilatadora independente de NO/Prostanoídes/EDH.

9) utilização de um degradador do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (catalase 1000 U/L), para avaliar a participação desta espécie reativa nas respostas encontradas.

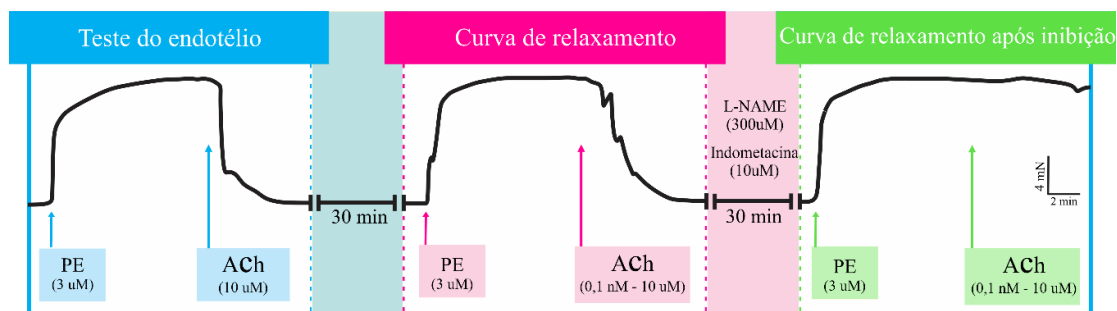


Figura 5. Representação esquemática dos protocolos de reatividade vascular (Rouver, 2021).

3.3.9. Análise da produção de ânion superóxido

Foi utilizada a técnica de fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídio (DHE) para verificar a influência da castração e dos tratamentos com testosterona sobre a produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$). O DHE é um derivado do etídio que ao entrar em contato com $O_2^{\bullet -}$, oxida-se e posteriormente se liga ao DNA das células emitindo fluorescência vermelha (Fernandes *et al.*, 2007; Wiggers *et al.*, 2008). Este método permite analisar a produção “*in situ*” nos segmentos teciduais.

Para isso, artérias mesentéricas de terceiro ramo foram isoladas, limpas e dissecadas dos tecidos aderentes e imediatamente congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Antes do preparo dos blocos em líquido de crioproteção (TissueTek – OCT Compound, Sakura), as amostras foram desidratadas em solução de Krebs (8 mM HEPES, 2 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 2,45 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 11,1 mM glicose, pH 7,4) com sacarose (30 %) por um período de 24 horas. Os blocos contendo as artérias mesentéricas foram armazenados em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento do preparo das lâminas. As lâminas gelatinizadas foram preparadas em criostato (CM 1850, Leica Microsystems, Alemanha), a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, com cortes transversais das artérias de $10\text{ }\mu\text{m}$ de espessura. Após o preparo, as lâminas foram armazenadas em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da análise.

Para a análise da fluorescência emitida pelo DHE, as lâminas com os cortes de artéria mesentérica foram secas em estufa a 37 °C por 20 minutos, em seguida, incubadas com solução de Krebs e mantidas em estufa por mais 30 minutos a 37 °C. Após esta etapa, o excesso de líquido foi retirado e as lâminas foram incubadas com DHE 2 µM e mantidas em estufa a 37 °C por 30 minutos. A fluorescência emitida foi visualizada em microscópio de fluorescência invertido (DM 2500, Leica Microsystems, Alemanha) equipado com câmera fotográfica. As imagens foram quantificadas pelo software ImageJ, sendo o resultado expresso como intensidade de fluorescência. Fotomicrografias de 4 animais por grupo foram realizadas. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Histologia Molecular e Imunohistoquímica (LHMI) da UFES.

3.3.10. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Artérias mesentéricas de terceira ordem, de 4 animais por grupo, foram fixadas em solução de Karnovisk (glutaraldeído 2,5 %, paraformaldeído 2 %, tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2) e mantidas a 2 °C por 24 horas. Em seguida, foram lavadas em tampão cacodilato (0,1 M, pH 7,2), 3 vezes sendo 10 minutos cada vez. Após esta etapa, as amostras foram desidratadas em gradiente crescente de etanol (30, 50, 70, 90 e 100 %) e submetidas à secagem por ponto crítico em CO₂ (Autosandri-815, Tousimis). Posteriormente, as artérias montadas em suporte metálico (*stubs*), com o endotélio exposto virado para cima, foram revestidas com 10 nm de ouro puro em um revestidor por pulverização a vácuo (Desk V, Denton Vacuum). As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JEM6610 LV). Todos os procedimentos de preparo das amostras e obtenção das imagens foram realizados no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins, LUCCAR, UFES.

3.4. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A normalidade dos dados foi confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk. Utilizou-se o método ROUT de Grubbs para detectar valores discrepantes entre os dados. As curvas concentração-resposta foram analisadas por ANOVA duas vias seguidas do teste *post-hoc* de *Tukey*. Para estimar e comparar a biodisponibilidade dos fatores de relaxamento endoteliais entre os grupos foi calculado a diferença das áreas abaixo da curva de concentração-resposta a ACh na presença e ausência (controle) dos inibidores utilizados. Comparação entre os diferentes grupos foi realizada com a análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA), seguido de teste *post-hoc* de *Tukey*. Todos os dados foram analisados pelo software Graphpad Prism 8 (La Jolla, CA – USA). O nível de significância estabelecido foi $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Parâmetros ponderais

O acompanhamento do peso corporal foi realizado durante todo o protocolo experimental, para isso, os animais foram pesados a cada duas semanas. Na Tabela 1 foram descritos os pesos corporais dos grupos nos dias: 0 (data da orquiectomia ou cirurgia fictícia); 14 (após 2 semanas de tratamento) e dia 28 (último dia de tratamento). O aumento do peso corporal ocorreu de maneira semelhante com o passar do tempo, para todos os grupos, indicando que os tratamentos não influenciaram no peso corporal dos animais.

Tabela 1: Valores do peso corporal (g) dos animais estudados nos dias 0, 14 e 28.

Peso Corporal (g)					
	SHAM (n=8)	ORX (n=7)	TTO (n=15)	TTO+ANA (n=9)	TTO+FIN (n=8)
Dia 0	130 ± 4	164 ± 7	148 ± 5	141 ± 9	154 ± 6
Dia 14	179 ± 5	184 ± 7	183 ± 4	169 ± 9	181 ± 8
Dia 28	210 ± 2	226 ± 5	211 ± 3	232 ± 6	224 ± 9

Valores expressos como média ± EPM. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via e pós-teste de *Tukey*.

De acordo com a Tabela 2, o tratamento com testosterona promoveu uma diminuição significativa no peso dos testículos dos animais do grupo TTO comparado ao SHAM, o mesmo não ocorreu nos grupos TTO+ANA e TTO+FIN. Já a orquiectomia causou uma diminuição no peso das vesículas seminais e da próstata e aumento no peso da hipófise e das glândulas adrenais comparado aos demais grupos. O epidídimo não sofreu alteração entre os tratamentos. Nos demais grupos não houve alteração, conforme indica a Tabela 2.

Tabela 2: Dados ponderais dos órgãos sexuais, hipófise e glândulas adrenais (mg/mm) dos grupos estudados.

(mg/mm)	SHAM (n=8)	ORX (n=7)	TTO (n=15)	TTO+ANA (n=9)	TTO+FIN (n=8)
Testículos	39,09 ± 0,49	-	32,76 ± 0,94 ^{*&\$}	38,00 ± 0,54	37,82 ± 0,65
V. Seminal	18,75 ± 1,13	2,09 ± 0,14 ^{*#&\$}	18,86 ± 1,09	19,12 ± 0,80	15,81 ± 0,31
Epidídimo	13,25 ± 0,36	-	12,91 ± 0,68	11,96 ± 0,27	12,66 ± 0,20
Próstata	6,33 ± 0,48	0,76 ± 0,11 ^{*#&\$}	6,28 ± 0,38	7,00 ± 0,23	6,17 ± 0,29
Hipófise	0,24 ± 0,02	0,30 ± 0,01 ^{*#&\$}	0,22 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,24 ± 0,01
Adrenal	0,32 ± 0,03	0,44 ± 0,02 ^{*#&\$}	0,32 ± 0,02	0,37 ± 0,02	0,31 ± 0,02

Valores expressos como média ± EPM. ^{*}p < 0,05 vs Sham; [#]p < 0,05 vs. TTO; [&]p < 0,05 vs. TTO+ANA; ^{\$}p < 0,05 vs. TTO+FIN. ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey.

Além destes, depósitos de tecidos adiposos também foram avaliados e podem ser observados os resultados na Tabela 3. O grupo TTO+FIN apresentou as maiores médias de tecido adiposo epididimal e perirrenal, já o grupo ORX apresentou os menores valores de médias nas gorduras retroperitoneal e perirrenal. O somatório (Σ) do peso das gorduras isoladas foi realizado para avaliarmos a composição de massa de gordura corporal, e o grupo TTO+FIN apresentou as maiores médias. No apêndice 2, fotos da cavidade abdominal exposta dos animais, obtidas no momento da pesagem podem ser observadas. O peso do músculo gastrocnêmio, do coração, dos ventrículos esquerdo e direito isolados, do fígado e dos rins não diferiram entre os grupos.

Tabela 3: Dados ponderais dos coxins de tecidos adiposos e demais órgãos (mg/mm) dos grupos estudados.

(mg/mm)	SHAM (n=8)	ORX (n=8)	TTO (n=8)	TTO+ANA (n=8)	TTO+FIN (n=8)
GE	24,4 ± 1,6	-	21,1 ± 0,8	22,8 ± 0,4	28,6 ± 0,7 ^{*#&}
GR	30,5 ± 5,3	13,6 ± 1,6 [*]	18,3 ± 2,4	19,9 ± 0,5	20,5 ± 4,4
GP	6,3 ± 0,4	3,3 v 0,3 ^{*#&\$}	6,1 ± 0,6	6,7 v 0,4	14,3 ± 0,8 ^{*#&}
∑ gorduras	18,4 ± 2	6,7 ± 1 ^{*#&\$}	14,5 ± 1	15,8 ± 1	23,3 ± 1 ^{#&}
Gastrocnêmio	27,6 ± 2	23,7 ± 2	25,9 ± 1	28,3 ± 1	31,6 ± 1
Fígado	270,1 ± 5,9	279,5 ± 7,8	260,9 ± 5,2	293,4 ± 10,1	249,8 ± 11,7
Rins	24,1 ± 0,7	21,9 ± 0,6	23,3 ± 0,3	24,6 ± 2,9	25,8 ± 0,8
Coração	29,6 ± 1,1	27,2 ± 1,1	25,6 ± 1,7	28,6 ± 1,1	29,9 ± 0,8
VD	2,2 ± 0,4	3,6 ± 0,4	3,2 ± 0,2	3,8 ± 0,1	3,7 ± 0,3
VE	21,8 ± 0,6	18,9 v 0,6	18,7 ± 1,1	20,9 ± 0,9	20,9 ± 0,7

GE: Gordura epididimal; GR: gordura retroperitoneal; GP: gordura perirrenal; VD: ventrículo direito; VE: ventrículo esquerdo; ∑: somatório. Valores expressos como média ± EPM. ^{*}p < 0,05 vs. Sham; [#]p < 0,05 vs. TTO; [&]p < 0,05 vs. TTO+ANA; ^{\$}p < 0,05 vs. TTO+FIN. ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey.

4.2. Concentrações séricas de testosterona

A Figura 6 apresenta o aumento significativo das concentrações séricas de testosterona nos grupos tratados com dose suprafisiológica deste hormônio (TTO: 2038,00 ± 431,2 µg/dL, n=6; TTO+ANA: 1537 ± 187,9 µg/dL, n=6; TTO+FIN: 1235,0 ± 113,3 µg/dL, n=6) quando comparados aos animais dos grupos SHAM (626,6 ± 21,93 µg/dL, n=6) e ORX (40,00 ± 12,6 µg/dL, n=6). No entanto, o tratamento com finasterida não apresentou diferença da concentração de testosterona em relação ao grupo SHAM.

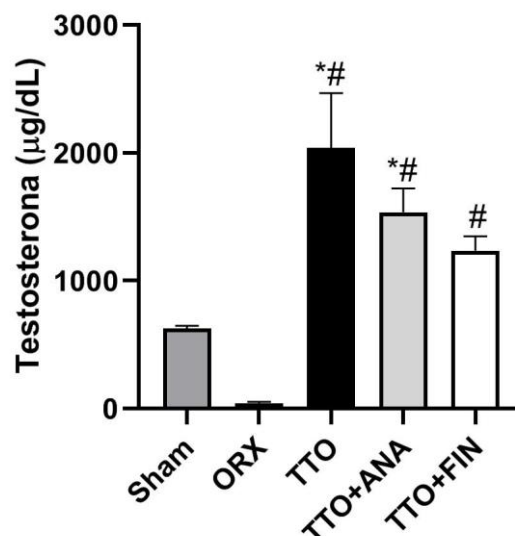


Figura 6. Nível sérico de testosterona. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs. SHAM; # $p < 0,05$ vs. ORX.

4.3. Concentrações séricas de 17 β -estradiol

Observando o nível sérico de 17 β -estradiol, a Figura 7 indica que houve diminuição significativa nos grupos TTO+ANA ($11,75 \pm 1,06$ $\mu\text{g/dL}$, $n=6$) e ORX ($11,69 \pm 1,4$ $\mu\text{g/dL}$, $n=6$) comparados aos grupos SHAM ($18,55 \pm 1,11$ $\mu\text{g/dL}$, $n=6$), TTO ($19,11 \pm 2,5$ $\mu\text{g/dL}$, $n=6$) e TTO+FIN ($18,93 \pm 1,6$ $\mu\text{g/dL}$, $n=6$).

Desse modo, observamos que a utilização do tratamento com dose suprafisiológica de testosterona combinada com inibição da aromatase, resulta em diminuição dos níveis de 17 β -estradiol similar à redução que ocorre após castração. Com esses resultados, também podemos analisar que tratamento com dose suprafisiológica de testosterona não aumenta significativamente a concentração de 17 β -estradiol nos animais.

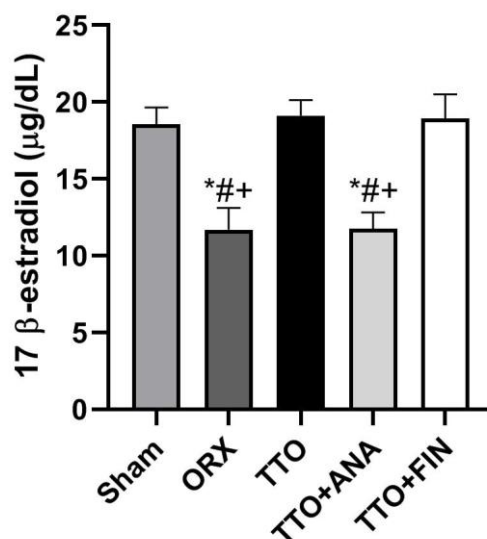


Figura 7. Nível sérico de 17 β-estradiol. Resultados expressos como média ± EPM. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs. SHAM. # $p < 0,05$ vs. TTO. + $p < 0,05$ vs. TTO+FIN.

4.4. Concentrações séricas de Dihidrotestosterona

Com relação ao nível sérico de dihidrotestosterona, apresentado na Figura 8, ocorreu uma diminuição significativa nos grupos ORX ($13,9 \pm 4,2 \mu\text{g/dL}$, $n=6$) e TTO+FIN ($54,84 \pm 9,41 \mu\text{g/dL}$, $n=6$), comparados aos grupos SHAM ($199,6 \pm 13,22 \mu\text{g/dL}$, $n=6$), TTO ($243,1 \pm 66,5 \mu\text{g/dL}$, $n=6$) e TTO+ANA ($203,4 \pm 34,7 \mu\text{g/dL}$, $n=6$).

Similar aos dados encontrados na dosagem sérica de 17 β-estradiol, a utilização de tratamento com Finasterida, inibidor da 5 α-redutase, houve diminuição significativa similar aos animais castrados. E ao mesmo tempo, não houve aumento de dihidrotestosterona significativa nos animais do grupo TTO.

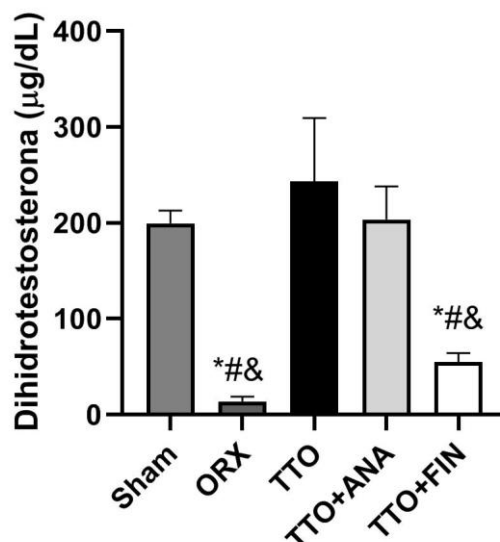


Figura 8. Nível sérico de dihidrotestosterona. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs. SHAM. # $p < 0,05$ vs. TTO. & $p < 0,05$ vs. TTO+ANA.

4.5. Pressão arterial

A medida indireta da pressão arterial sistólica e diastólica foi realizada por pletismografia da artéria caudal (Tabela 4). Não houve diferença entre os grupos em nenhum parâmetro avaliado.

Tabela 4: Valores de pressão arterial sistólica e diastólica (mmHg) dos animais dos grupos estudados.

	SHAM (n=8)	TTO (n=10)	ORX (n=8)	TTO+ANA (n=8)	TTO+FIN (n=8)
Pressão arterial sistólica (mmHg)					
Dia 0	149,5 $\pm$ 8,5	141,0 $\pm$ 1,4	140,1 $\pm$ 1,4	143,2 $\pm$ 5,8	146,1 $\pm$ 4,3
Dia 14	161,1 $\pm$ 7,1	178,8 $\pm$ 9,8	175,0 $\pm$ 3,1	178,4 $\pm$ 4,7	164,3 $\pm$ 2,3
Dia 28	172,9 $\pm$ 2,0	175,3 $\pm$ 3,1	189,7 $\pm$ 5,2	190,7 $\pm$ 8,3	189,9 $\pm$ 5,0
Pressão arterial diastólica (mmHg)					
Dia 0	107,7 $\pm$ 1,5	108,9 $\pm$ 1,4	107,5 $\pm$ 1,1	114,4 $\pm$ 6,94	110,5 $\pm$ 3,1
Dia 14	121,7 $\pm$ 7,5	140,3 $\pm$ 9,8	137,9 $\pm$ 1,4	131,5 $\pm$ 3,6	116,9 $\pm$ 1,9
Dia 28	133,4 $\pm$ 7,9	138,3 $\pm$ 5,3	142,1 $\pm$ 2,81	135,8 $\pm$ 4,1	145,0 $\pm$ 3,5

Valores expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey.

4.6. Reatividade vascular de artérias mesentéricas de resistência

4.6.1. Vasodilatação dependente do endotélio

Com a utilização de curvas concentração-resposta à ACh nas artérias mesentéricas de resistência, foi possível avaliar o efeito da orquiectomia e dos demais tratamentos sobre a vasodilatação dependente do endotélio. A resposta mediada por este agonista vasodilatador produziu relaxamento dependente da concentração em todos os grupos. No entanto, houve um prejuízo na resposta vasodilatadora no grupo ORX comparado aos grupos SHAM e TTO (AAC SHAM $557,3 \pm 18,30$ u.a.; AAC TTO $518,0 \pm 16,71$ u.a.; AAC ORX $394,9 \pm 28,83$ u.a.) (Figura 9).

Como não houve alteração na resposta vasodilatadora nas artérias mesentéricas obtidas dos animais tratados com dose suprafisiológica de testosterona comparado ao SHAM, investigamos a possível participação do estrogênio na modulação dessa resposta, com a inibição da enzima aromatase utilizando o tratamento com o Anastrozol. Além disso, para melhor caracterizarmos o efeito da testosterona, inibimos sua conversão à dihidrotestosterona, seu metabólito mais ativo. Para tal, utilizamos o tratamento com Finasterida, inibidor da enzima 5α -redutase.

Como pode ser observada na Figura 9, quando comparados com o grupo TTO, a inibição da conversão ao estrogênio não alterou a resposta vasodilatadora (AAC TTO+ANA $449,2 \pm 31,46$ u.a.), contudo, a inibição da formação da dihidrotestosterona causou prejuízo vasodilatador (AAC TTO+FIN $328,3 \pm 39,61$ u.a.). Podendo ser atribuído a dihidrotestosterona a participação significativa na resposta vasodilatadora à ACh, em ratos hipertensos tratados com dose

suprafisiológica de testosterona. A Tabela 5 apresenta os valores de resposta máxima (Rmax) obtidos, menores respostas foram atribuídas aos grupos ORX e TTO+FIN.

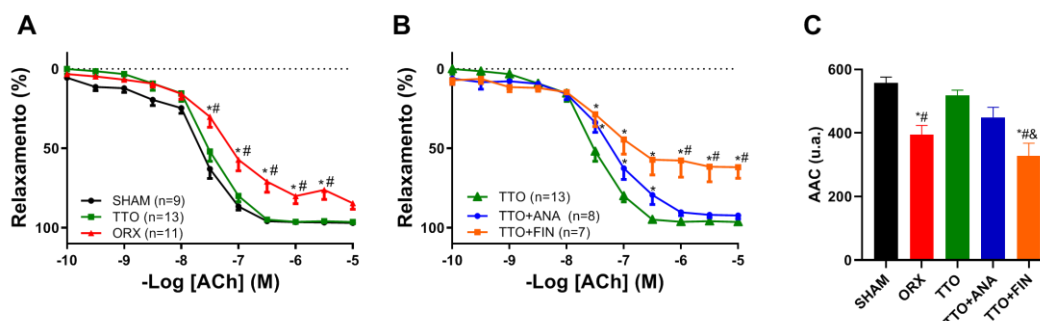


Figura 9. Curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de ratos hipertensos (A) grupos SHAM, TTO e ORX, (B) TTO, TTO+ANA e TTO+FIN e (C) AAC. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. SHAM; # $p < 0,05$ vs. TTO; & $p < 0,05$ vs. TTO+ANA. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Para AAC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Número de ratos indicado entre parênteses.

Tabela 5. Valores de Rmax obtidos das curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de SHR dos grupos estudados.

Rmax (%)				
SHAM	TTO	ORX	TTO+ANA	TTO+FIN
96,99 $\pm$ 0,4	96,34 $\pm$ 0,7	84,04 $\pm$ 3,5 ^{*#}	92,22 $\pm$ 2,2	61,87 $\pm$ 7,1 ^{*#&\$}

Valores expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. SHAM. # $p < 0,05$ vs. TTO. & $p < 0,05$ vs. ORX. \$ $p < 0,05$ vs TTO+ANA. ANOVA uma via e pós-teste de Tukey.

4.6.2. Mediadores endoteliais envolvidos na vasodilatação à acetilcolina

Buscando identificar a participação das vias do NO, prostanoídes e da EDH na resposta vasodilatadora dependente do endotélio, investigamos as respostas induzidas pela acetilcolina na presença de alguns inibidores.

4.6.3. Participação do óxido nítrico

Mesmo não apresentando alteração na resposta vasodilatadora à acetilcolina, o tratamento com testosterona (TTO) (Figura 10) promoveu alteração na participação das vias endoteliais de relaxamento. O aumento na concentração sérica de testosterona atenuou na participação do óxido nítrico, quando comparado ao grupo SHAM (dAAC SHAM $502,9 \pm 5,67$ u.a.; dAAC TTO $402,6 \pm 36,9$ u.a.). Resposta esta observada com a maior capacidade vasodilatadora, induzido pela acetilcolina, na presença de L-NAME no grupo TTO comparado aos demais grupos. Esse fato não foi observado no animal orquiectomizado (dAAC ORX $322,6 \pm 17,73$ u.a.), este mantém o óxido nítrico como principal modulador da resposta vasodilatadora, mesmo apresentando menor vasodilatação à acetilcolina.

Como observado na Figura 10, o grupo TTO+ANA apresentou prejuízo ainda maior no relaxamento dependente do óxido nítrico, uma vez que, sua capacidade de relaxamento independente de NO foi maior do que a resposta observada no grupo TTO (dAAC TTO+ANA $293,6 \pm 45,93$). Sendo assim, o 17 β -estradiol parece ser importante para a ação vasodilatadora do NO, e na sua diminuição sérica outras vias de relaxamento independentes de NO parecem estar envolvidas na resposta vasodilatadora a ACh.

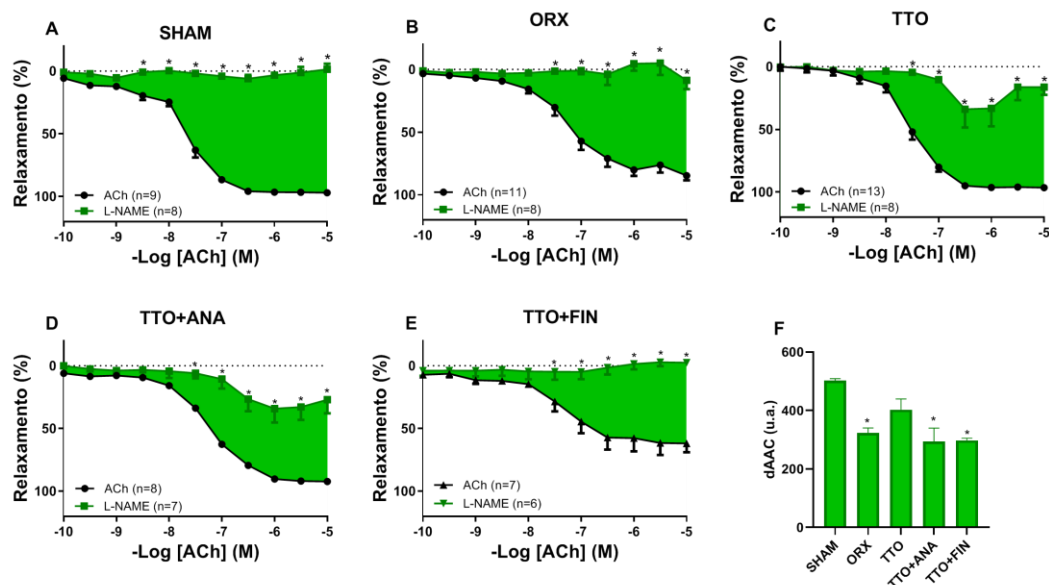


Figura 10. Curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de SHR dos grupos estudados na presença ou ausência de L-NAME (300 μ M). (A) SHAM, (B) ORX, (C) TTO, (D) TTO+ANA, (E) TTO+FIN e (F) dAAC. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. ACh. dAAC na presença de L-NAME, * $p < 0,05$ vs. SHAM. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Para dAAC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Número de ratos indicado entre parênteses.

Já o grupo tratado com finasterida demonstrou maior participação do óxido nítrico na resposta vasodilatadora comparada ao TTO. A resposta analisada no grupo TTO+FIN foi semelhante à encontrada no grupo ORX, com menor relaxamento à ACh, porém dependente da via do óxido nítrico (dAAC TTO+FIN $297,8 \pm 7,45$). A Tabela 6 apresenta os valores de resposta máxima obtidos, maior resposta foi observada no grupo TTO+ANA.

Tabela 6. Valores de Rmax obtidos das curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de SHR na presença de L-NAME.

Rmax (%)				
SHAM	TTO	ORX	TTO+ANA	TTO+FIN
-1,47 ± 4,4	16,2 ± 6,3	8,7 ± 7,08	26,98 ± 10,94*	-2,6 ± 2,9

Valores expressos como média ± EPM. * p < 0,05 vs. SHAM. ANOVA uma via e pós-teste de Tukey.

4.6.4. Participação dos prostanoídes

Ficou evidente após a inibição da COX, a participação de seus derivados vasodilatadores na resposta vasodilatadora no grupo TTO (dAAC TTO 222,2 ± 41,74 u.a.). Pode-se observar na Figura 11, menor vasodilatação, após inibição, apenas no grupo TTO. Nos grupos SHAM e ORX, os prostanoídes derivados da COX não alteraram o padrão de relaxamento à acetilcolina (dAAC SHAM 157,3 ± 52,33 u.a.; dAAC ORX 144,2 ± 60,9 u.a.).

Observou-se que na presença de Indometacina a resposta vasodilatadora não foi alterada significativamente nesses grupos (dAAC TTO+ANA 74,9 ± 37,45 u.a.; dAAC TTO+FIN 14,2 ± 74,97 u.a.), indicando que a modulação dos prostanoídes ocorreu por ação do estrogênio e da dihidrotestosterona, porque na ausência desses hormônios não ocorreu prejuízo na vasodilatação como observado no grupo TTO. Ou seja, para que ocorra ação vasodilatadora via prostanoídes é necessária à participação de estrogênio e dihidrotestosterona.

A Tabela 7 apresenta os valores de resposta máxima obtida entre os grupos estudados. Não houve diferença entre os grupos.

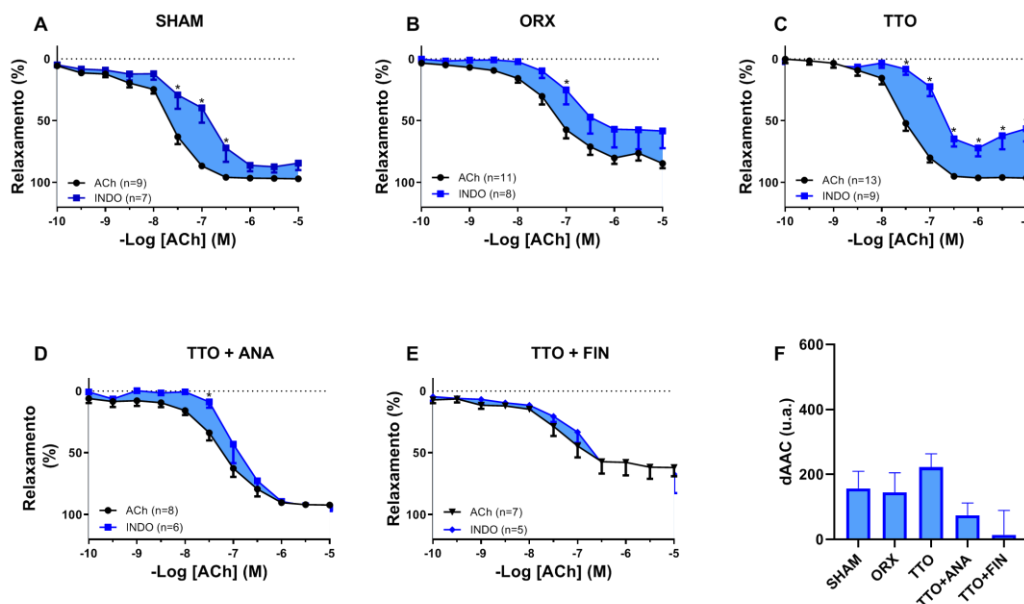


Figura 11. Curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de SHR dos grupos SHAM, ORX, TTO, TTO+ANA e TTO+FIN na presença ou ausência de Indometacina (10 μ M). (A) SHAM, (B) ORX, (C) TTO, (D) TTO+ANA, (E) TTO+FIN e (F) dAAC. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. ACh. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Para dAAC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Número de ratos indicado entre parênteses.

Tabela 7. Valores de Rmax obtidos das curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de SHR na presença de Indometacina.

Rmax (%)				
SHAM	TTO	ORX	TTO+ANA	TTO+FIN
84,30 $\pm$ 5,7	56,35 $\pm$ 10,3	58,19 $\pm$ 14,1	94,30 $\pm$ 2,9	67,2 $\pm$ 15,5

Valores expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA uma via e pós-teste de Tukey.

Em sequência, investigamos se a resposta do grupo TTO poderia estar associada à participação dos prostanoídes derivados da COX-2 (Figura 12). Observou-se que na presença de NS398, ocorreu uma maior tendência a redução na resposta vasodilatadora à acetilcolina no grupo tratado (dAAC SHAM 22,34 $\pm$ 47,07

u.a.; dAAC TTO $108,6 \pm 70,89$ u.a.), porém não significativo estatisticamente. Não houve diferença nos valores obtidos de resposta máxima na presença de NS398 (Tabela 8).

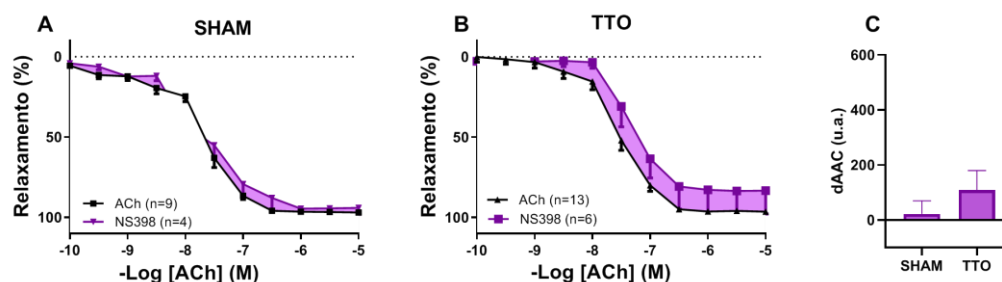


Figura 12. Curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de SHR dos grupos SHAM e TTO, na presença ou ausência de NS398 (1 μ M). (A) SHAM, (B) TTO e (C) dAAC. dAAC na presença de NS398. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Para dAAC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Número de ratos indicado entre parênteses.

Tabela 8. Valores de Rmax obtidos das curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de SHR na presença de NS398.

Rmax (%)	
SHAM	TTO
$94,07 \pm 4,1$	$83,25 \pm 14,6$

Valores expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA uma via e pós-teste de Tukey.

4.6.5. Participação da hiperpolarização dependente do endotélio (EDH)

Como a resposta vasodilatadora no grupo TTO não foi completamente abolida após inibições das vias formadoras de óxido nítrico e de prostanoídes, utilizando separadamente L-NAME e Indometacina, avaliou-se a possível participação da EDH. Para isso, realizamos curvas concentração-resposta à acetilcolina após utilização dos inibidores L-NAME (300 μ M) e Indometacina (10 μ M), ao mesmo tempo, nos grupos propostos (Figura 13). Desse modo, a resposta vasodilatadora remanescente poderia

ser atribuída à EDH, uma vez que a acetilcolina é um vasodilatador endotélio-dependente.

Observamos que após a inibição das vias de NO e prostanoídes, a resposta vasodilatadora foi diminuída significativamente nos grupos SHAM e ORX (dAAC SHAM $456,5 \pm 13,27$ u.a.; dAAC ORX $304,6 \pm 22,67$ u.a.). Maior vasodilatação foi observada no grupo TTO (dAAC TTO $332,8 \pm 25,71$ u.a.), sendo assim, foi necessário levar em consideração a participação de outro(s) fator(es) vasodilatador(es) endotelial(ais).

Para avaliarmos se esta resposta teve participação de estrogênio ou de dihidrotestosterona, realizamos o mesmo protocolo nos grupos TTO+ANA e TTO+FIN. De acordo com a Figura 13, a resposta vasodilatadora a acetilcolina após a inibição das vias do óxido nítrico e dos prostanoídes apresentou resultados diferentes nesses grupos. Utilizando o anastrozol, a resposta vasodilatadora foi similar a encontrada no grupo TTO, mostrando que com a redução dos níveis séricos de 17β -estradiol, os segmentos arteriais relaxam com a participação de outras vias endoteliais (dAAC TTO+ANA $268,4 \pm 47,25$ u.a.). Já no animal tratado com finasterida, após inibição das vias formadoras de NO e prostanoídes, menor foi a resposta vasodilatadora encontrada (dAAC TTO+FIN $237,5 \pm 42,18$ u.a.). A Tabela 9 apresenta as repostas máximas obtidas após a inibição simultânea nos grupos. Maior resposta foi encontrada no grupo TTO+ANA.

Como a inibição com L-NAME e INDO apresentou resultado similar à inibição individual com L-NAME no grupo TTO+FIN, podemos sugerir que o prejuízo na participação do óxido nítrico no relaxamento vascular no grupo TTO pode ser atribuído à presença de dihidrotestosterona.

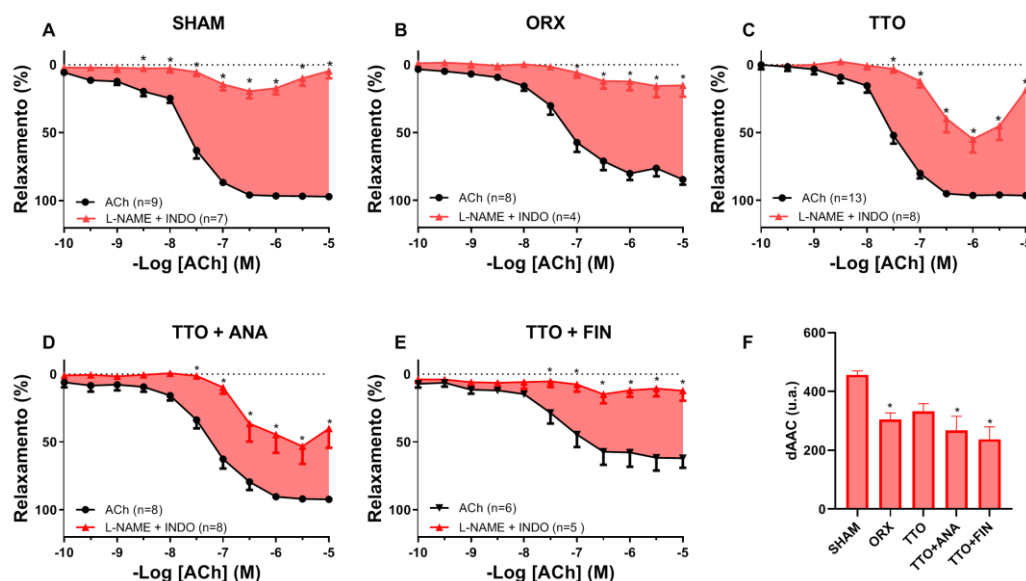


Figura 13. Curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de SHR dos grupos SHAM, ORX, TTO, TTO+ANA e TTO+FIN na presença (simultânea) ou ausência de L-NAME (100 μ M) e Indometacina (10 μ M). (A) SHAM, (B) ORX, (C) TTO, (D) TTO+ANA, (E) TTO+FIN e (F) dAAC. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. ACh. dAAC na presença de L-NAME e Indometacina, * $p < 0,05$ vs. SHAM. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Para dAAC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Número de ratos indicado entre parênteses.

Tabela 9. Valores de Rmax obtidos das curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de SHR na presença simultânea de L-NAME e Indometacina

Rmax (%)				
SHAM	TTO	ORX	TTO+ANA	TTO+FIN
4,48 $\pm$ 5,48	18,71 $\pm$ 2,54	15,11 $\pm$ 8,5	40,04 $\pm$ 14,2	12,20 $\pm$ 7,5

Valores expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. SHAM. & $p < 0,05$ vs. TTO+FIN. ANOVA uma via e pós-teste de Tukey

4.6.6. Participação da via dos EETs

Seguimos nas investigações com a avaliação da participação da via dos EETs, (Figura 14). Não observamos participação desta via nos animais do grupo TTO (dAAC 60,0 $\pm$ 53,2 u.a.) e TTO+FIN, no entanto, nos demais grupos os EETs apresentam uma participação significativa no relaxamento induzido pela acetilcolina

(SHAM dAAC $311,8 \pm 56,66$ u.a.; ORX dAAC $188,5 \pm 74,19$ u.a.). No grupo TTO+ANA (TTO+ANA dAAC $282,8 \pm 52,15$ u.a.; TTO+FIN dAAC $79,94 \pm 51,93$ u.a.) ocorreu uma diminuição na resposta vasodilatadora, indicando que o estrogênio participa negativamente na modulação dessa resposta. Os resultados de resposta máxima são apresentados na Tabela 10, e mostram que houve diferença entre os grupos, menor resposta observada no grupo TTO+ANA.

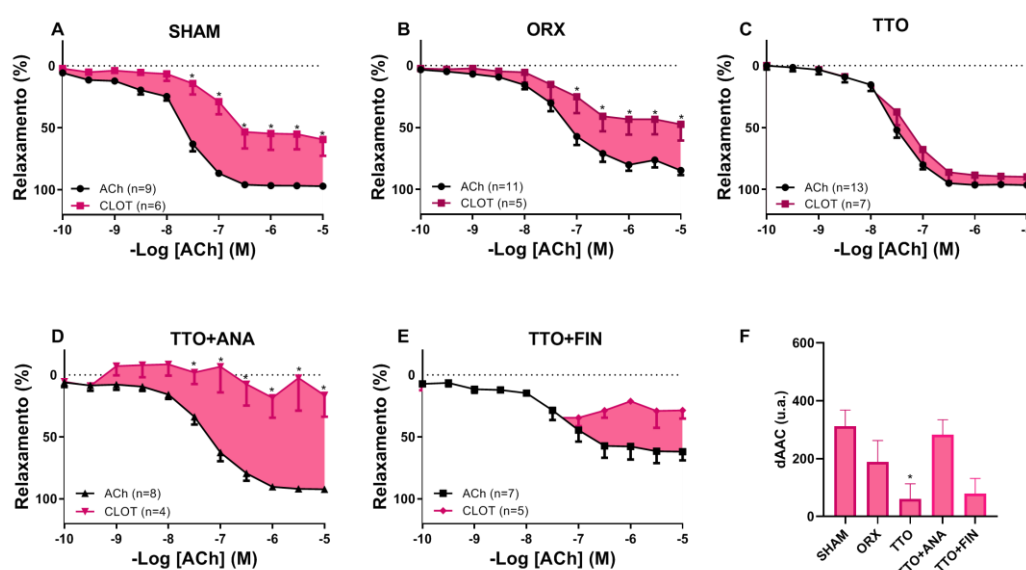


Figura 14. Curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de SHR dos grupos SHAM, ORX e TTO na presença ou ausência de Clotrimazol ($0,75 \mu\text{M}$). (A) SHAM, (B) ORX, (C) TTO, (D) TTO+ANA, (E) TTO+FIN e (F) dAAC. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. ACh. dAAC na presença de Clotrimazol, * $p < 0,05$ vs. SHAM. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Para dAAC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Número de ratos indicado entre parênteses.

Tabela 10. Valores de Rmax obtidos das curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de SHR na presença de Clotrimazol.

Rmax (%)				
SHAM	TTO	ORX	TTO+ANA	TTO+FIN
$59,3 \pm 13,3$	$89,75 \pm 5,7$	$47,4 \pm 13,1$	$16,34 \pm 17,4^{\#}$	$39,31 \pm 30,6$

Valores expressos como média $\pm$ EPM. $\# p < 0,05$ vs. TTO. ANOVA uma via e pós-teste de Tukey.

Investigamos a inibição simultânea da via dos EETs, do óxido nítrico e dos prostanoídes (Figura 15). Nesse caso, maior relaxamento foi encontrado no grupo TTO (dAAC $377,0 \pm 46,88$ u.a.), semelhante ao resultado encontrado após inibição apenas com L-NAME e Indometacina. Possivelmente no animal do grupo TTO, os EETs não participam do relaxamento induzido pela acetilcolina. Contudo, no grupo TTO+ANA a participação da via dos EETs no relaxamento a ACh foi significativa (TTO+ANA dAAC $253,3 \pm 61,79$ u.a.). Dessa forma, com a diminuição na concentração de 17β -estradiol maior foi a ação da via dos EETs na modulação da resposta vasodilatadora. Nos demais grupos analisados, os EETS também desempenharam um papel significativo como moduladores da resposta vasodilatadora (SHAM dAAC $409,4 \pm 45,7$ u.a.; ORX dAAC $266,5 \pm 51,73$ u.a.; TTO+FIN dAAC $153,6 \pm 44,31$). Com relação a resposta máxima (Tabela 11), não houve diferença entre os grupos.

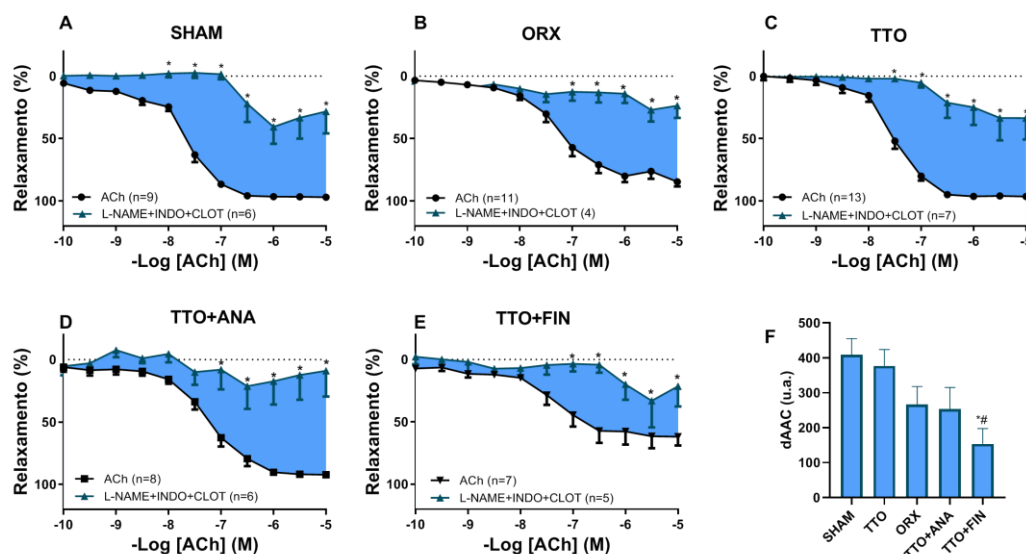


Figura 15. Curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de SHR dos grupos SHAM, ORX e TTO na presença ou ausência de Clotrimazol, L-NAME e Indometacina. (A) SHAM, (B) ORX, (C) TTO, (D) TTO+ANA, (E) TTO+FIN e (F) dAAC. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. ACh. dAAC na presença de L-NAME, Indometacina e Clotrimazol, * $p < 0,05$ vs. SHAM; # $p < 0,05$ vs. TTO. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Para dAAC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Número de ratos indicado entre parênteses.

Tabela 11. Valores de Rmax obtidos das curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de SHR na presença de L-NAME, Indometacina e Clotrimazol.

Rmax (%)				
SHAM	TTO	ORX	TTO+ANA	TTO+FIN
28,28 $\pm$ 17,6	33,44 $\pm$ 17,3	23,63 $\pm$ 9,8	8,89 $\pm$ 20,8	21,39 $\pm$ 16,3

Valores expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA uma via e pós-teste de Tukey

4.6.7. Participação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Como nesse ponto ainda não havíamos identificado um possível candidato a mediador da EDH, responsável em parte, pela resposta vasodilatadora no grupo TTO, avaliamos a participação do peróxido de hidrogênio como vasodilatador. De acordo com a Figura 16, o relaxamento não foi alterado nos grupos SHAM, ORX, TTO e TTO+FIN, sugerindo que o peróxido de hidrogênio não participa na resposta

vasodilatadora induzida pela acetilcolina nesses grupos (SHAM dAAC $152,9 \pm 77,84$ u.a.; TTO dAAC $141,8 \pm 68,04$ u.a.; ORX dAAC $21,75 \pm 79,2$ u.a.; TTO+FIN dAAC $-33,3 \pm 183,3$ u.a). Contudo, no grupo TTO+ANA (TTO+ANA dAAC $361,9 \pm 14,51$ u.a.) houve uma diminuição significativa da resposta vasodilatadora, indicando que o estrogênio parece modular essa via endotelial. Menor resposta máxima foi observada no grupo TTO+ANA (Tabela 12).

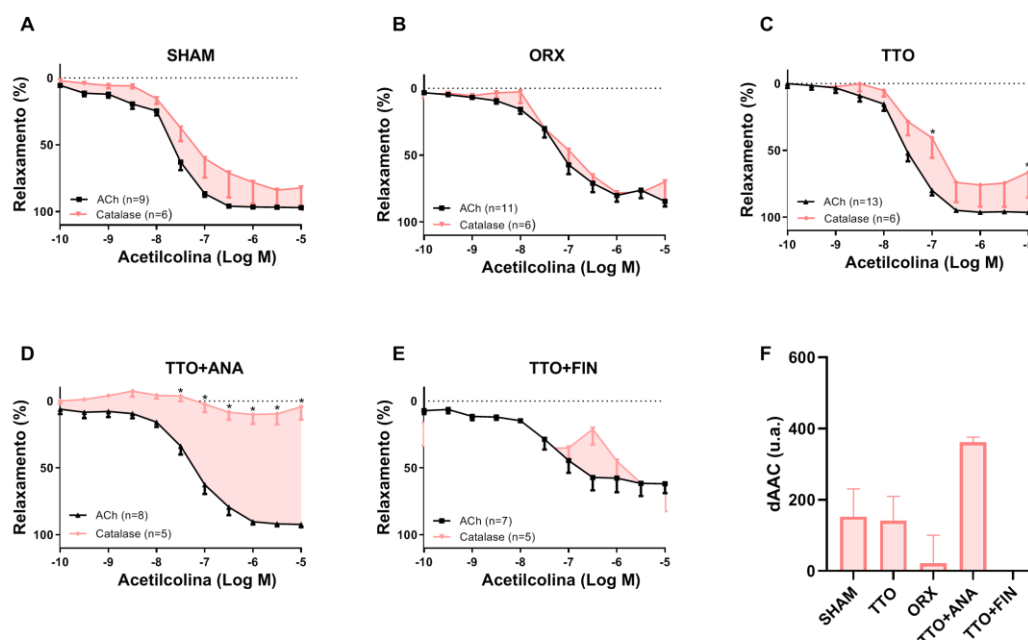


Figura 16. Curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de SHR dos grupos SHAM, ORX e TTO na presença ou ausência de Catalase (1000 U/mL). (A) SHAM, (B) ORX, (C) TTO, (D) TTO+ANA, (E) TTO+FIN e (F) dAAC. dAAC na presença de Catalase. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. Controle; # $p < 0,05$ vs. TEA. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (two-way ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. Para dAAC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (one-way ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. Número de ratos indicado entre parênteses.

Tabela 12. Valores de Rmax obtidos das curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de SHR na presença de Catalase.

Rmax (%)				
SHAM	TTO	ORX	TTO+ANA	TTO+FIN
82,12 ± 16,6	66,3 ± 19,1	69,87 ± 15,2	4,20 ± 9,7*	62,42 ± 20,1

Valores expressos como média ± EPM. * $p < 0,05$ vs. SHAM. ANOVA uma via e pós-teste de Tukey

4.6.8. Avaliação da participação dos canais para K^+

Investigamos a participação dos canais para potássio na resposta vasodilatadora à acetilcolina após bloqueio não seletivo desses canais. Como pode ser observado na Figura 17, ocorreu diminuição significativa do relaxamento induzido por acetilcolina no grupo SHAM (dAAC 405,8 ± 32,73 u.a.), no grupo ORX (dAAC 340,1 ± 20,27 u.a.) no grupo TTO (dAAC 357,1 ± 49,89 u.a.), no grupo TTO+ANA (dAAC 188,6 ± 84,62 u.a.) e menor participação dessa via no grupo TTO+FIN (dAAC 119,6 ± 87,48 u.a.). Não houve diferença significativa entre as respostas máximas comparando entre os grupos (Tabela 13).

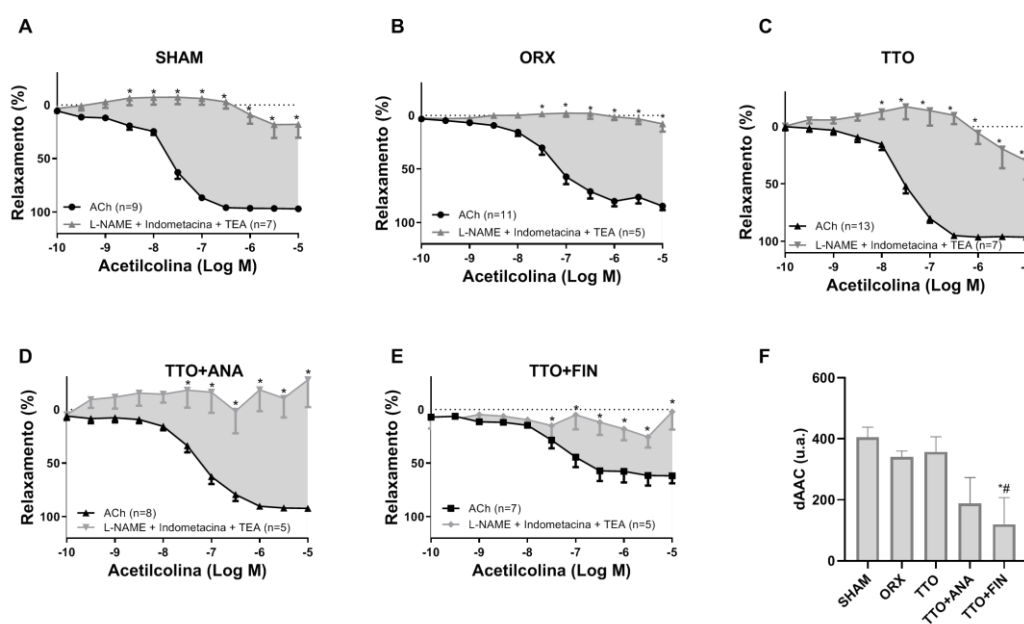


Figura 17. Curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de SHR dos grupos SHAM, TTO e ORX na presença ou ausência de TEA (5 mM). (A) SHAM, (B) ORX, (C) TTO, (D) TTO+ANA, (E) TTO+FIN e (F) dAAC. dAAC na presença de TEA. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. Controle. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Para dAAC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Número de ratos indicado entre parênteses.

Tabela 13. Valores de Rmax obtidos das curvas concentração-resposta à acetilcolina em artérias mesentéricas de SHR na presença de TEA.

Rmax (%)				
SHAM	TTO	ORX	TTO+ANA	TTO+FIN
18,05 $\pm$ 12,7	29,82 $\pm$ 16,3	7,76 $\pm$ 7,4	-27,7 $\pm$ 25,6	2,01 $\pm$ 16,8

Valores expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA uma via e pós-teste de Tukey

4.7. Efeito dos tratamentos sobre a presença de espécies reativas de oxigênio em artérias mesentéricas de resistência

A presença de $O_2^{\bullet-}$ foi significativamente maior nos animais dos grupos TTO+ANA (175,6 $\pm$ 17,5 u.a.; n=4), ORX (141,0 $\pm$ 13,5 u.a.; n=4), TTO+FIN (97,78 $\pm$ 11,53; n=4) e TTO (82,45 $\pm$ 9,8 u.a.; n=4) quando comparados ao grupo SHAM (41,88 $\pm$ 3,75 u.a.; n=4) (Figura 18).

Esses resultados sugerem que, a ausência de testosterona (grupo ORX) promove maior disfunção endotelial, com aumento de EROs, do que o tratamento com dose suprafisiológica. Porém, tratamento com dose suprafisiológica associado à inibição da conversão ao estrogênio, viabilizaria maior formação de $O_2^{\bullet-}$ no ambiente vascular comparado aos demais grupos.

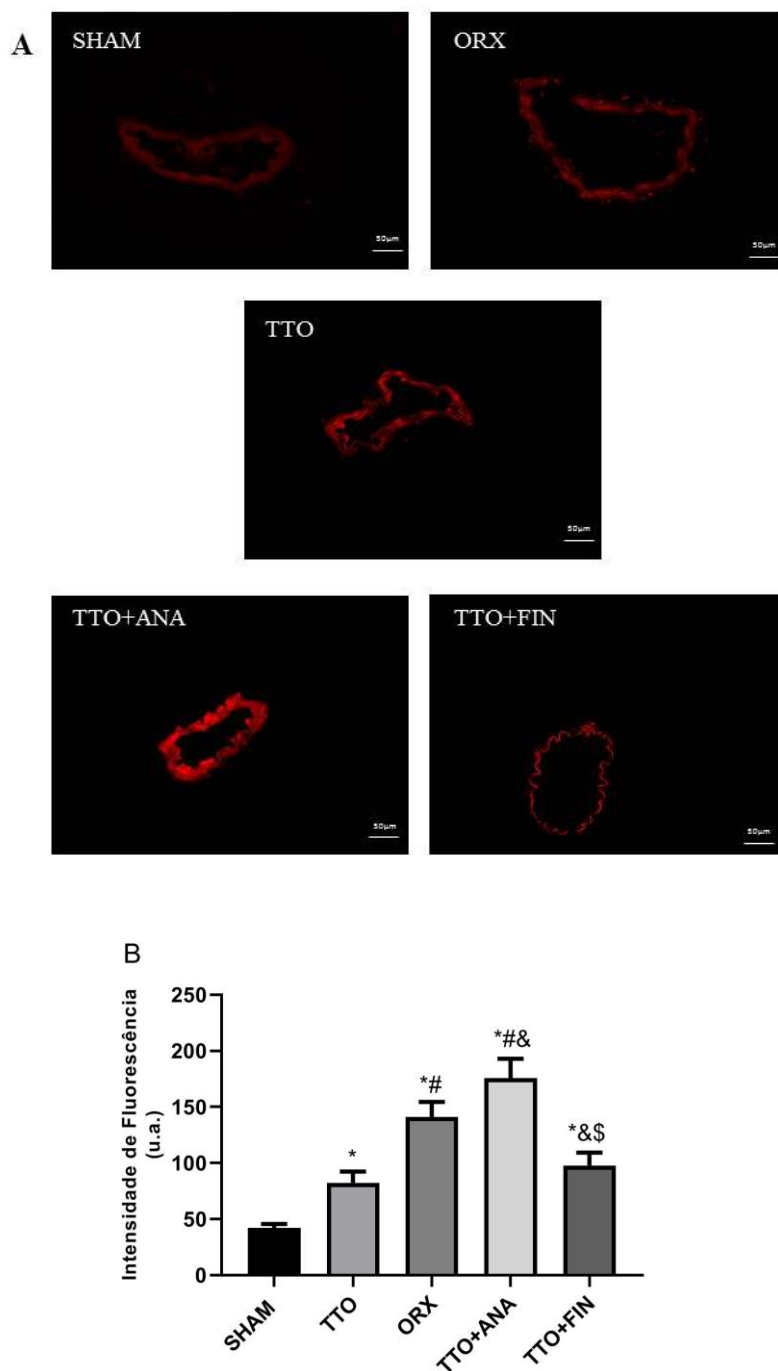


Figura 18. (A) Análise representativa da microscopia de fluorescência emitida por dihidroetídio (DHE) em artérias mesentéricas nos diferentes grupos e (B) e análise semi-quantitativa de $O_2^{\bullet-}$. Barra de escala = 50 μm . Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA uma via e pós-teste de Tukey, * $p < 0,05$ vs. SHAM; # vs. TTO; & vs. ORX; \$ vs. TTO+ANA.

4.8. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Como foi observado dano funcional e disfunção endotelial pela redução da biodisponibilidade de NO e pelo aumento de EROs, a superfície do endotélio vascular

de artérias mesentéricas de terceira ordem foram observadas, por microscopia eletrônica de varredura, para analisar a ocorrência de eventual dano tecidual. A análise qualitativa mostrou alterações significativas com os tratamentos (Figura 19).

No grupo SHAM, a superfície endotelial era regular e acompanhava a direção longitudinal do vaso. O grupo TTO apresentou uma camada endotelial com danos evidentes, áreas de descamação, presença de fibrina e células sanguíneas aderidas à superfície do tecido. No grupo ORX, observamos uma superfície contínua e lisa, com áreas difusas indicando espessamento e perda da arquitetura e disposição típica das células endoteliais. Já no grupo TTO+ANA observamos uma desordem na superfície da camada endotelial, desarranjo celular com mudança na forma e na disposição do endotélio, atrofia celular, células destacadas do tecido subendotelial indicando um remodelamento. Por fim, no grupo TTO+FIN observamos um tecido endotelial semelhante ao encontrado no grupo TTO, porém com alterações em menor proporção.

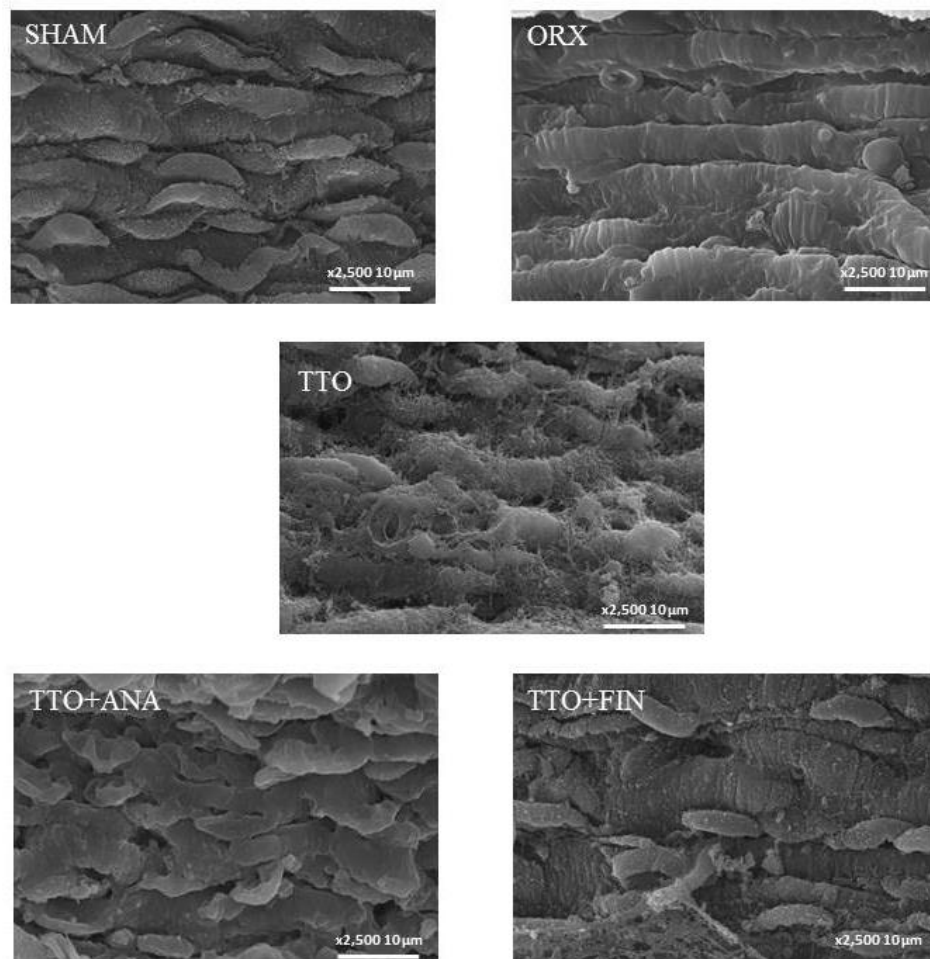


Figura 19. Microscopia eletrônica de varredura do endotélio de artérias mesentéricas de terceira ordem dos grupos propostos. Cada imagem foi obtida com 2500x de magnificação.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O principal achado deste estudo foi demonstrar a capacidade da testosterona de modular o ambiente vascular, alterando as vias de relaxamento endotelial para possível manutenção da vasodilatação, mesmo em concentrações suprafisiológicas em modelo experimental de hipertensão. Em contraste, baixa concentração de testosterona (ORX) resultou em menor resposta vasodilatadora. O E2 mostrou-se essencial para o relaxamento vascular, pois apresentou a capacidade de modular a ação do óxido nítrico e dos prostanoídes, enquanto a dihidrotestosterona pode ser considerada responsável pela diminuição da ação do óxido nítrico.

Neste trabalho, confirmamos a eficácia da orquiectomia e dos tratamentos utilizando dosagem dos níveis séricos hormonais e pesagem dos órgãos sexuais acessórios (Martin *et al.*, 2005; Blanco-Riviero, Balfagon & Ferrer, 2005), e encontramos no grupo ORX: (1) redução acentuada dos níveis plasmáticos de testosterona, 17 β -estradiol e dihidrotestosterona, (2) diminuição do peso da próstata e da vesícula seminal, órgãos sexuais acessórios hormônio-dependentes e (3) aumento de peso das glândulas adrenais e da hipófise, possivelmente por uma maior ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal buscando estimular maior produção de testosterona via glândulas adrenais. Aproximadamente 5 % (200 μ g) da síntese diária de testosterona é derivada das adrenais, e estudo em pacientes com câncer de próstata já demonstrou que as adrenais podem produzir um adicional de 200 μ g de testosterona por formação periférica derivada de androstenediona (Stanford *et al.*, 1977).

Já nos animais tratados com dose suprafisiológica de testosterona (grupo TTO), ocorreu uma diminuição no peso dos testículos, alteração esperada, visto que, a

administração exógena de andrógenos pode provocar supressão do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal por feedback negativo, levando à atrofia testicular, diminuição da produção endógena de testosterona e espermatogênese reduzida (Kanayama & Hearrison, 2018b; Coward *et al.*, 2013).

Os níveis sorológicos de testosterona aumentaram no grupo TTO comparado ao SHAM, atingindo níveis considerados suprafisiológicos (Reckelhoff, Zhang & Granger, 1998; Rouver *et al.*, 2015; Dalmaso *et al.*, 2017). Ao quantificarmos a concentração sérica dos metabólitos da testosterona, não encontramos diferença significativa na concentração de E2 e de DHT no grupo TTO comparado ao SHAM. No entanto, em tratamento com testosterona com dose suprafisiológica descrito por Dalmaso e colaboradores (2017), a concentração de estrogênio foi 3 vezes maior em machos SHR. O tratamento com anastrozol reduziu a concentração de E2 no grupo TTO+ANA de forma eficaz, resultando em uma concentração similar a do grupo ORX. Outros estudos já demonstraram a capacidade do anastrozol em reduzir a concentração sérica de E2, em ratos (Manigrasso *et al.*, 2011). E o tratamento com finasterida, no grupo TTO+FIN também foi eficiente em reduzir a concentração sérica de DHT, com consequente redução da concentração de testosterona, em relação ao grupo TTO. Resultado semelhante foi encontrado em ratos Wistar tratados com finasterida, na mesma dosagem por 4 meses, resultando em redução sérica superior a 50% de DHT e testosterona, sem redução significativa dos níveis de estrogênio (Baig *et al.*, 2019).

Embora tenhamos analisado os níveis séricos hormonais para confirmação da eficácia do tratamento, o foco do estudo foi avaliar a capacidade da testosterona e seus metabólitos em modular a reatividade vascular em artérias de resistência de animais hipertensos. Para isso, artérias mesentéricas de terceira ordem, que

contribuem substancialmente para a resistência vascular periférica (Christensen & Mulvany, 1993), foram investigadas.

Nossos resultados mostraram que o tratamento com dose suprafisiológica de testosterona (grupo TTO) não promoveu prejuízo no relaxamento vascular induzido pela acetilcolina como ocorreu no grupo ORX, que apresentou disfunção na resposta vasodilatadora dependente do endotélio, sugerindo que, na vigência de hipertensão arterial, baixos níveis de testosterona parecem ser mais prejudiciais do que altos níveis. Similar aos nossos resultados, ratos castrados por 4 semanas apresentaram diminuição na vasodilatação para acetilcolina em artérias mesentéricas (Toot *et al.*, 2012), em artérias pudendas internas (Alves-Lopes *et al.*, 2017) e em corpo carnosos (Kataoka *et al.*, 2017). E em nosso grupo de pesquisa, a castração de ratos normotensos também teve impacto negativo na vasodilatação a bradicinina em leito coronariano (Rouver *et al.*, 2015), no entanto, o mesmo não ocorreu em leito coronariano de animais hipertensos (Arapa-Diaz *et al.*, 2020).

Como já existem evidências crescentes de que as ações biológicas tradicionalmente atribuídas à testosterona podem de fato ser mediadas pelos seus metabólitos, dihidrotestosterona, um metabólito mais potente, ou 17 β -estradiol (Simpson, Mahendroo & Means, 1994; Sherbet, 2007; Miller & Auchus, 2011; Stocco, 2012; Schiffer *et al.*, 2018), avaliamos o papel do E2 e da DHT na reatividade vascular de animais tratados com dose suprafisiológica de testosterona. A inibição da conversão de testosterona em E2 não modificou a resposta para ACh nas artérias dos animais TTO, sugerindo que o estrógeno não contribui para a resposta vasodilatadora dependente do endotélio nestes animais. Em estudo prévio do nosso grupo, resultados similares foram descritos em ratos SHR tratados com testosterona e anastrozol, sem prejuízo significativo na vasodilatação dependente do endotélio em leito vascular

coronariano (Arapa-Diaz *et al.*, 2020). Em aorta de camundongos *knockout* para enzima aromatase, também não foi observado prejuízo na vasodilatação a acetilcolina (Kimura *et al.*, 2003). Por outro lado, os resultados encontrados no grupo TTO+FIN indicaram que a DHT altera a homeostase vascular, pois com sua concentração reduzida, a vasodilatação a ACh foi diminuída.

Sendo a testosterona relacionada à disfunção endotelial, que é caracterizada pela redução da capacidade das células endoteliais de secretarem vasodilatadores com aumento da produção de vasoconstritores (Schiffrin, Deng & Larochelle, 1993; Vanhoutte *et al.*, 2009), nosso próximo passo foi investigar a participação do NO na resposta vasodilatadora à ACh utilizando L-NAME (inibidor não-seletivo da NOS). O resultado desse experimento indicou que após inibição da formação de NO a vasodilatação dependente do endotélio foi completamente abolida no grupo SHAM e ORX, indicando nesses grupos que a vasodilatação era dependente de NO. Diferente disso, no grupo TTO parte da resposta vasodilatadora foi preservada, sugerindo menor dependência em relação ao NO e também que altas concentrações séricas de testosterona modulam o ambiente vascular e estimulam a ação de outros fatores vasodilatadores, possivelmente PGI₂ e EDH. Outros estudos indicaram que tratamento com dose suprafisiológica de testosterona promove diminuição da ação do NO e prejuízo vascular, em ratos normotensos e hipertensos (Toot *et al.*, 2012; Guzzoni *et al.*, 2018).

Com o intuito de identificar a participação dos metabólitos da testosterona na redução da participação do NO na vasodilatação à acetilcolina, utilizamos a mesma inibição (L-NAME) nos grupos tratados com anastrozol e finasterida. O tratamento com anastrozol não alterou a vasodilação induzida por ACh quando comparada com grupo TTO, sugerindo que o E2 não modula a liberação de NO. Em trabalho prévio

publicado por nosso grupo, o relaxamento induzido por E2 não foi dependente de NO em artérias coronárias de ratos normotensos (Santos *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2016). Esse resultado difere de outros estudos que indicam a habilidade do E2 em modular a síntese de NO (Rusko & Vanbreemen, 1995; Le Mellay *et al.*, 1997; Geary, Krause & Duckles, 2000), provavelmente pela alta concentração de E2 usada nesses estudos comparados ao nosso trabalho. A concentração de E2 no presente trabalho dependeu da aromatização da testosterona em 17 β -estradiol e como já é de conhecimento essa conversão é baixa, ocorrendo apenas em 0,2 % da testosterona total nos homens saudáveis (Simpson, Mahendroo & Means, 1994; Stocco, 2012). Por outro lado, no grupo TTO+FIN a vasodilatação foi abolida após inibição com L-NAME, indicando a importância do DHT como modulador da via do NO.

Para avaliarmos a participação dos prostanoídes vasodilatadores derivados da COX, realizamos curva concentração-resposta à acetilcolina após incubação com indometacina, um inibidor não-seletivo da COX. Nossos resultados indicaram diminuição da vasodilatação à ACh apenas no grupo TTO, indicando que a testosterona aumenta a ação dos derivados COX. Suspeitamos que o aumento na participação dos prostanoídes no grupo TTO poderia ser derivado da via COX-2, por que a COX-2 (isoforma induzível) é mais expressa em condições inflamatórias, responsável pelo aumento da produção de prostaciclina em situações de doenças (Catella-Lawson *et al.*, 1999; Morita, 2002). No entanto, após a inibição seletiva dessa via, utilizando NS398, não houve alteração na vasodilatação à ACh no grupo TTO em relação ao grupo SHAM. Assim, podemos indicar que o aumento da participação dos prostanoídes no grupo TTO foi dependente da via COX-1, porque após utilização de indometacina que é mais sensível à COX-1 (Kurumbail, 1996), houve diminuição da vasodilatação. E como já foi descrito que o E2 pode regular

positivamente a expressão de COX-1 promovendo maior síntese de prostaciclina (Orshal & Khalil, 2004; Santos *et al.*, 2016), e que o aumento de prostanoídes observado no grupo TTO não ocorreu no grupo TTO+ANA, acreditamos que a resposta observada no grupo TTO seja dependente da ação do E2 sobre a COX-1.

Como a resposta vasodilatadora no grupo TTO não foi totalmente abolida após a inibição das vias formadoras de óxido nítrico e de prostanoídes, utilizando L-NAME ou indometacina separadamente, avaliamos a possível participação da EDH com a utilização dos mesmos inibidores simultaneamente (Campbell & Harder, 2001) e observamos maior participação da EDH no grupo TTO. Uma vez que, essa resposta não foi alterada no grupo TTO+ANA e foi reduzida no grupo TTO+FIN, concluímos que a vasodilatação mediada pela EDH foi dependente de DHT.

Além do NO e prostanoídes, os ácidos epoxieicosatrienoícos (EETs), derivados do ácido araquidônico pela ação da enzima citocromo P450 (CYP), possuem capacidade vasodilatadora pela habilidade de aumentar a probabilidade de abertura canais para potássio ativados por cálcio (K_{Ca}) provocando a hiperpolarização do músculo liso vascular (Huang *et al.*, 2005). Dado ao seu local de síntese e suas ações sobre o MLV, os EETs são definidos como EDH (Campbell & Harder, 2001). Dito isto, investigamos a participação dos EETs na resposta vasodilatadora a acetilcolina, primeiro utilizando a inibição isolada com clotrimazol. No grupo SHAM houve uma diminuição do relaxamento na presença de clotrimazol, indicando a participação dos EETs no relaxamento à ACh. Quando analisada a resposta no grupo ORX, observa-se atenuação desse relaxamento na presença de clotrimazol, sugerindo que os hormônios modulam essa via. Porém, ao se analisar o grupo TTO, não se observa nenhuma alteração do relaxamento à ACh na presença de clotrimazol, indicando que doses suprafisiológicas de TTO ou a DHT não parecem alterar essa via.

Porém, o relaxamento é praticamente abolido após inibição do E2, sugerindo que esse hormônio, parece inibir essa via vasoativa. Contrariamente, nosso grupo em pesquisa demonstrou que ação vasodilatadora do E2 no leito coronariano de ratos foi mediada, em parte, pela liberação de EETs (Santos *et al.*, 2016). Já após inibição simultânea com L-NAME, indometacina e clotrimazol não houve diferença significativa entre os grupos.

Nosso próximo passo foi avaliar a participação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), formado a partir da dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pela enzima superóxido dismutase e um dos mediadores envolvidos na EDH (Matoba *et al.*, 2000; Campbell & Harder, 2001), na vasodilatação dependente do endotélio induzida pela ACh utilizando a catalase. Notamos que a resposta vasodilatadora foi abolida apenas no grupo TTO+ANA. Dessa forma, podemos sugerir que com a diminuição sérica de E2 a via do H_2O_2 foi mais ativa na resposta vasodilatadora, indicando a capacidade do E2 em modular negativamente a ação da testosterona sobre esta via, similar como ocorreu na ação dos EETs. A ação do H_2O_2 é mais evidente quando a biodisponibilidade do NO parece estar afetada (Kang *et al.*, 2011) e pode favorecer a liberação endotelial de NO, indicando uma adaptação celular aguda a um cenário de estresse oxidativo (Cai *et al.*, 2003). Por fim, ao avaliarmos a reatividade vascular dependente de canais para potássio, observamos que em todos os grupos há participação efetiva dos canais para potássio de maneira similar.

Para verificar a possível relação dos resultados de reatividade vascular obtidos e a geração de EROs, como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), usamos a técnica de fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídio (DHE). O DHE é um derivado do etídio que, ao entrar em contato com as EROs se oxida e posteriormente se liga ao DNA das células, emitindo fluorescência vermelha (Fernandes *et al.*, 2007). O

aumento de EROs, como o $O_2^{\bullet-}$, está associado à redução da biodisponibilidade de NO e diminuição da atividade de enzimas antioxidantes (Meydan *et al.*, 2010). No grupo TTO, houve aumento significativo na formação de EROs, quando comparado com SHAM, o que podemos sugerir uma associação com a diminuição da ação do óxido nítrico. No grupo ORX, a diminuição na concentração sérica de testosterona provocou maior disfunção endotelial, com aumento de EROs, quando comparado ao tratamento com dose suprafisiológica. Resultados similares, com diminuição da vasodilatação a acetilcolina, já foram descritos em animais castrados (del Campo *et al.*, 2014; Kataoka *et al.*, 2017). No entanto, nossos resultados mostraram que o tratamento com dose suprafisiológica associado à inibição da conversão a E2, possibilitou maior formação de EROs em relação aos demais grupos.

O tratamento com testosterona em doses suprafisiológica, comumente é associado à utilização de inibidores da aromatase, como o anastrozol (Rhoden & Morgentaler, 2004; Basaria *et al.*, 2010), para prevenção de ginecomastia (crescimento do tecido mamário em homens), um dos efeitos adversos (Wieacker *et al.*, 2010). Nesse tipo de tratamento, como realizado no grupo TTO+ANA, o ambiente vascular pode ser ainda mais prejudicado quando comparado à utilização isolada de testosterona, visto o papel cardioprotetor do estrogênio.

Como observamos danos funcionais e disfunção endotelial devido à redução da biodisponibilidade do NO e aumento do EROs, possivelmente de $O_2^{\bullet-}$, a superfície do endotélio vascular das artérias mesentéricas de terceira ordem foi observada por microscopia eletrônica de varredura para analisar a ocorrência de possíveis danos estruturais. Observamos nas imagens obtidas anormalidades na aparência do tecido endotelial tanto na ausência de testosterona (ORX) quanto nos animais tratados com dose suprafisiológica (TTO, TTO+ANA e TTO+FIN). A camada endotelial

apresentou alterações físicas com áreas de descamação e presença de fibrina, resultando em uma superfície endotelial irregular. Essa mudança estrutural pode ser responsável pelo dano no relaxamento endotélio-dependente nos grupos, uma vez que as células endoteliais contribuem para uma superfície não adesiva e não trombogênica em situações saudáveis, mas em condições patológicas se torna pró-adesivo e pró-coagulante. Dano as células endoteliais contribuem para a disfunção endotelial com superfície pró-inflamatória, aumento da liberação de substâncias vasoativas como trombina e endotelina, resultando em desregulação do tônus vascular e elevação da pressão arterial (Li *et al.*, 2015).

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Nosso trabalho indica que a testosterona modula o ambiente vascular para manutenção da resposta vasodilatadora, mesmo com níveis séricos suprafisiológicos, por meio de alteração na participação dos vasodilatadores endoteliais. Essa modulação depende da participação de E2 e DHT. A testosterona, em situações com diminuição dos níveis séricos de E2 e consequente, prejuízo na ação do NO e dos prostanoídes vasodilatadores, estimula a ação dos EETs e do H_2O_2 para manter a resposta vasodilatadora. Já na diminuição sérica da DHT, a testosterona melhora ação do NO. A caracterização desses mecanismos pode auxiliar na compreensão do efeito do tratamento com dose suprafisiológica de hormônios sexuais masculinos sobre o sistema vascular e no desenvolvimento de melhores formas de terapia na deficiência sérica de hormônios sexuais testiculares. Além disso, nossos dados indicam o impacto do uso de inibidores das enzimas 5α -redutase e aromatase sobre o sistema vascular.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- Achar S, Rostamian A, Narayan SM. Cardiac and metabolic effects of anabolic-androgenic steroid abuse on lipids, blood pressure, left ventricular dimensions, and rhythm. *The American Journal of Cardiology*, 106(6):893-901, 2010.
- Aird MC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium. Structure, function and mechanisms. *Circulation Research*, 100:158-173, 2007.
- Altintas D, Kolcu A, Kandemir B, Tosun M, Cetinkaya MB. Comparison of the effects of raloxifene and anastrozole on experimental endometriosis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 150(1):84-87, 2010.
- Alves-Lopes R, Neves KB, Silva MA, Olivon VC, Ruginsk SG, Antunes-Rodrigues J, Carneiro FS. Functional and structural changes in internal pudendal arteries underlie erectile dysfunction induced by androgen deprivation. *Asian Journal of Andrology*, 19(5):526, 2017.
- Anishchenko AM, Aliev OI, Sidekhmenova AV, Shamanaev AY, Plotnikov MB. Dynamics of blood pressure elevation and endothelial dysfunction in SHR rats during the development of arterial hypertension. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 159(5), 591-593, 2015
- Armeni E, Lambrinoudaki I. Androgens and cardiovascular disease in women and men. *Maturitas*, 104:54-72, 2017.
- Asuthkar S, Elustondo PA, Demirkhanyan L, Sun X, Baskaran P, Velpula KK, Zakharian E. The TRPM8 protein is a testosterone receptor: I. Biochemical evidence for direct TRPM8-testosterone interactions. *The Journal of biological chemistry*, 290(5):2659–69, 2015.
- Ayaz O, Howlett SE. Testosterone modulates cardiac contraction and calcium

- homeostasis: cellular and molecular mechanisms. *Biology of Sex Differences*, 6(1):9, 2015.
- Baig MS, Kolasa-Wolosiuk A, Pilutin A, Safranow K, Baranowska-Bosiacka I, Kabat-Koperska J, Wiszniewska B. Finasteride-Induced Inhibition of 5 α -Reductase Type 2 Could Lead to Kidney Damage—Animal, Experimental Study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(10):1726, 2019.
- Baillargeon J, Urban RJ, Ottenbacher KJ, Pierson KS, Goodwin JS. Trends in androgen prescribing in the United States, 2001 to 2011. *JAMA Internal Medicine*, 173:1465–6, 2013.
- Baillargeon J, Kuo YF, Westra JR, Urban RJ, Goodwin JS. Testosterone Prescribing in the United States, 2002-2016. *JAMA Internal Medicine*, 320(2):200–202, 2018.
- Basaria S, Coviello AD, Travison TG, Storer TW, Farwell WR, Jette AM, Eder RBA, Tennstedt S, Ulloor J, Zhang A, Choong K, Lakshman KM, Mazer NA, Miciek R, Krasnoff J, Elmi A, Knapp PE, Brooks BS, Appleman E, Aggarwal S, Bhasin GBA. Adverse events associated with testosterone administration. *New England Journal of Medicine*, 363(2):109-122, 2010.
- Basaria S, Wahlstrom JT, Dobs AS. Anabolic-androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(11):5108-5117, 2001.
- Blanco-Rivero J, Balfagón G, Ferrer M. Male castration increases neuronal nitric oxide synthase activity in the rat mesenteric artery through protein kinase C activation. *Journal of Vascular Research*, 42(6):526-534, 2005.
- Bringel SS, de Amorim Júnior AA, Amorim MJAAL, Brito LT, Morais RN, de

- Torres SM, da Silva Junior VA. (2013). Endocrine and testicular changes induced by olanzapine in adult Wistar rats. *Journal of Applied Toxicology*, 33(1):24-31, 2013.
- Brown-Séquard CE. Note on the effects produced on man by subcutaneous injections of a liquid obtained from the testicles of animals. *Lancet*, 2:105-107, 1889.
- Butenandt A. Über die chemische Untersuchung des Sexualhormons. *Zeitschrift für Angewandte Chemie*, 44:905–908, 1931.
- Butenandt A, Hanisch G. Über Testosteron. Umwandlung des Dehydroandrosterons in Androstendiol und Testosteron; ein Weg zur Darstellung des Testosterons aus Cholesterin. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 237:89–98, 1935.
- Burt VL, Whelton P, Roccella EJ, Brown C, Cutler JA, Higgins M, Horan MJ, Labarthe D. Prevalence of hypertension in the USA adult population. Results from the third national health and nutrition examination survey, 1988-1991. *Hypertension*, 25:305-313, 1995.
- Busse R, Edwards G, Félétou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. EDHF: bringing the concepts together. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23(8):374-380, 2002.
- Caliman IF, Bernabe CS, de Melo Jr AF, Brasil GA, do Nascimento AM, de Lima EM., Figueiredo SG, Andrade TU, Bissoli, N. S. Long-term treatment with Nandrolone Decanoate impairs mesenteric vascular relaxation in both sedentary and exercised female rats. *Steroids*, 120:7-18, 2017.
- Campbell WB, Harder DR. EDHF - what is it? *American Journal of Physiology*, 280: H2413-H2416, 2001.

- Campelo AE, Cutini PH, Massheimer VL. Cellular actions of testosterone in vascular cells: Mechanism independent of aromatization to estradiol. *Steroids*, 77:1033–1040, 2012.
- Cai H, Li Z, Davis ME, Kanner W, Harrison DG, Dudley SC. Akt-dependent phosphorylation of serine 1179 and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 cooperatively mediate activation of the endothelial nitric-oxide synthase by hydrogen peroxide. *Molecular pharmacology*, 63(2), 325-331. 2003.
- Cai JJ, Wen J, Jiang WH, Lin J, Hong Y, Zhu YS. Androgen actions on endothelium functions and cardiovascular diseases. *Journal of Geriatric Cardiology: JGC*, 13(2):183-196, 2016.
- Cairrão E, Álvarez E, Santos-Silva AJ, Verde I. Potassium channels are involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 376(5):375-383, 2008.
- Catella-Lawson F, Mcadam B, Morrison BW, Kapoor S, Kujubu D, Antes L, Lasseter KC, Quan H, Gertz BJ, Fitzgerald GA. Effects of specific inhibition of cyclooxygenase-2 on sodium balance, hemodynamics, and vasoactive eicosanoids. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 289(2):735-741, 1999.
- Charles J. Flickinger (1978). Effects of testosterone enanthate on the structure of the male reproductive tract of the rat. *The Anatomical Record*, 192(4):555–583, 1978.
- Charles J. Flickinger (1978). Effects of testosterone enanthate on the structure of the male reproductive tract of the rat. *The Anatomical Record*, 192(4):555–583, 1978.

- Chignalia AZ, Schuldts EZ, Camargo LL, Montezano AC, Callera GE, Laurindo FR, Lopes LR, Avellar MCW, Carvalho MHC, Fortes ZB, Touyz RM, Tostes RC. (2012). Testosterone induces vascular smooth muscle cell migration by NADPH oxidase and c-Src-dependent pathways. *Hypertension*, 59(6):1263-1271, 2012.
- Christensen KL, Mulvany MJ. Mesenteric arcade arteries contribute substantially to vascular resistance in conscious rats. *Journal of Vascular Research*, 30:73–79, 1993.
- Cho L, Davis M, Elgendy I, Epps K, Lindley KJ, Mehta PK, Volgman, AS. Summary of updated recommendations for primary prevention of cardiovascular disease in women: JACC state-of-the-art review. *Journal of the American College of Cardiology*, 75 (20):2602-2618, 2020.
- 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. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 72(1-5):23-30, 2001.
- Clark BJ, Wells J, King SR, Stocco DM. The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *Journal of Biological Chemistry*, 269(45): 28314-28322, 1994.
- CONCEA-MCT. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação-Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – DBCA. In Brazilian Government, p. 1–50, 2016.

- Coward RM, Rajanahally S, Kovac JR, Smith RP, Pastuszak AW, Lipshultz LI. Anabolic steroid induced hypogonadism in young men. *The Journal of Urology*, 160(6):2200-2205, 2013.
- Costarella CE, Stallone JN, Rutecki GW, Whittier FC. Testosterone causes direct relaxation of rat thoracic aorta. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 277(1):34-39, 1996.
- Cussons AJ, Bhagat CI, Fletcher SJ, Walsh JP. Brown-Sequard revisited: a lesson from history on the placebo effect of androgen treatment. *Medical Journal of Australia*, 177(11/12):678-679, 2002.
- Dalmasso C, Patil CN, Yanes Cardozo LL, Romero DG, Maranon RO. Cardiovascular and metabolic consequences of testosterone supplements in young and old male spontaneously hypertensive Rats: Implications for testosterone supplements in men. *Journal of the American Heart Association*, 6(10), e007074, 2017
- Deansley R, Parkes AS. Factors influencing effectiveness of administered hormones. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences*, 124:279–98, 1937.
- Deenadayalu VP, White RE, Stallone JN, Gao X, Garcia AJ. Testosterone relaxes coronary arteries by opening the large-conductance, calcium-activated potassium channel. *American Journal of Physiology Heart Circulation Physiology*, 281:H1720–H1727, 2001.
- Deenadayalu V, Puttabyatappa Y, Liu AT, Stallone JN, White RE. Testosterone-induced relaxation of coronary arteries: activation of BK_{Ca} channels via the cGMP-dependent protein kinase. *American Journal of Physiology Heart Circulation Physiology*, 302: H115–H123, 2012.

- del Campo L, Guvenc Tuna B, Ferrer M, van Bavel E, Bakker EN. Testosterone and β -oestradiol prevent inward remodelling of rat small mesenteric arteries: role of NO and transglutaminase. *Clinical Science*, 124(12):719-728, 2013.
- Dufau ML. The luteinizing hormone receptor. *Annual Review of Physiology*, 60(1):461-496, 1998.
- Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*, 93(3):515-524, 1988.
- Fernandes DC, Wosniak JJ, Pescatore LA, Bertoline MA, Liberman M, Laurindo FRM, Santos CXC. Analysis of DHE-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292(1):C413-C422, 2007.
- Fluck CE, Miller WL, Auchus RJ. The 17, 20-lyase activity of cytochrome P450c17 from human fetal testis favors the $\Delta 5$ steroidogenic pathway. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(8):3762-3766, 2003.
- Folkow B, Hallbäck M, Lundgren Y, Weiss L. Background of increased flow resistance and vascular reactivity in spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiologica Scandinavica*, 80(1):93-106, 1970.
- Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, 23(6.2):1121-1131, 1994.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789):373, 1980.

- Gao W, Kearbey JD, Nair VA, Chung K, Parlow AF, Miller DD, Dalton JT. Comparison of the pharmacological effects of a novel selective androgen receptor modulator, the 5 α -reductase inhibitor finasteride, and the antiandrogen hydroxyflutamide in intact rats: new approach for benign prostate hyperplasia. *Endocrinology*, 145(12):5420-5428, 2004.
- Gaudillière JP. Better prepared than synthesized: Adolf Butenandt, Schering Ag and the transformation of sex steroids into drugs (1930–1946). *Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 36:612–64, 2005.
- Geary GG, Krause DN, Duckles SP. Estrogen reduces mouse cerebral artery tone through endothelial NOS and cyclooxygenase dependent mechanisms. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 279(2):H511-H519, 2000.
- Grino P B, Griffin JE, Wilson JD. Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. *Endocrinology*, 126(2):1165–1172, 1990.
- Grollman A, Harrison TR, Williams Jr. The effect of various sterol derivatives on the blood pressure of the rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 69:149–155, 1940.
- Gryglewski RJ, Palmer RMJ, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*, 320(6061):454-456, 1986.
- Gullett NP, Hebbar G; Ziegler TR. Update on clinical trials of growth factors and anabolic steroids in cachexia and wasting. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91(4):1143S-1147S, 2010.

- Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circulation Research*, 86(9):e85-e90, 2000.
- Guzzoni V, Cunha TS, das Neves VJ, Briet L, Costa R, Moura MJCS, Oliveira V, Franco MCP, Novaes PD, Marcondes FK. Nandrolone combined with strenuous resistance training reduces vascular nitric oxide bioavailability and impairs endothelium-dependent vasodilation. *Steroids*, 131:7-13, 2018
- Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(8):2994-2998, 1975.
- Hamberg M, Svensson J, Wakabayashi T, Samuelsson, B. Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides that cause platelet aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(2):345-349, 1974.
- Hammond GL, Smith CL, Underhill DA. Molecular studies of corticosteroid binding globulin structure, biosynthesis and function. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 40(4-6): 755-762, 1991.
- Hammond GL, Bocchinfuso WP. Sex hormone-binding globulin/androgen-binding protein: steroid-binding and dimerization domains. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 53(1-6):543-552, 1995.
- Handelsman DJ. Androgen misuse and abuse. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 25(2):377-389, 2011.
- Handelsman DJ. Irrational exuberance in testosterone prescribing: when will the bubble burst? *Medical care*, 53(9):743-745, 2015.

- Handelsman DJ. Testosterone: use, misuse and abuse. *Medical Journal of Australia*, 185(8):436-439, 2006.
- Hanukoglu I. Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 43:779–804, 1992.
- Harno E, Edwards G, Geraghty AR, Ward DT, Dodd RH, Dauban P, Weston AH. Evidence for the presence of GPRC6A receptors in rat mesenteric arteries. *Cell Calcium*, 44(2):210–219, 2008.
- Hatano Y, Nakamura K, Moriyama S, Mori K, Toda N. The contractile responses of isolated dog cerebral and extracerebral arteries to oxybarbiturates and thiobarbiturates. *Anesthesiology*, 71(1):80-86, 1989.
- Heinlein CA, Chang C. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Molecular Endocrinology*, 16:2181-2187, 2012.
- Herbison, AE. Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. *Nature Reviews Endocrinology*, 12(8):452, 2016.
- Hess RA, Bunick D, Lee KH, Bahr J, Taylor JA, Korach KS, Lubahn DB. A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature*, 390(6659):509, 1997.
- Honda H, Unemoto T, Kogo H. Different mechanisms for testosterone-induced relaxation of aorta between normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 34:1232-1236, 1999.
- Huang An, Sun D, Jacobson A, Carroll MA, Falek JR, Kaley G. Epoxyeicosatrienoic acids are released to mediate shear stress-dependent hyperpolarization of arteriolar smooth muscle. *Circulation Research*, 96:376-383, 2005.

- Iamsaard S, Sukhorum W, Samrid R, Yimdee J, Kanla P, Chaisiwamongkol K, Kondo H. The sensitivity of male rat reproductive organs to monosodium glutamate. *Acta medica academica*, 43(1), 2014.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84:9265-9269, 1987. Jang H, Ha US, Kim SJ, Yoon BI, Han DS, Yuk SM, Kim SW. Anthocyanin extracted from black soybean reduces prostate weight and promotes apoptosis in the prostatic hyperplasia-induced rat model. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(24):12686-12691, 2010.
- 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*, 138:733-744, 2003.
- Kanayama GMD, Kaufman MJ, Harrison GPJr. Public health impact of androgens. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 25(3):218-223, 2018 (A).
- Kanayama GMD, Harrison GPJr. History and epidemiology of anabolic androgens in athletes and non athletes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 468:4-13, 2018 (B).
- Kanayama GMD, Hudson JI, Harrison GPJr. Long-term psychiatric and medical consequences of anabolic-androgen steroid abuse: a looming public health concern? *Drug Alcohol Depend*, 98:1-2, 2008.

- Kang HY, Tsai MY, Chang C, Huang KE. Mechanisms and clinical relevance of androgens and androgen receptor actions. *Chang Gung Medical Journal*, 26(6):388-402, 2003.
- Kang KT. Endothelium-derived Relaxing Factors of Small Resistance Arteries in Hypertension, 30(3):141-148, 2014
- Kang LS, Chen B, Reyes RA, LeBlanc AJ, Teng B, Mustafa SJ, Muller-Delp JM. Aging and estrogen alter endothelial reactivity to reactive oxygen species in coronary arterioles. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 300(6), H2105-H2115, 2011.
- Kataoka T, Hotta Y, Maeda Y, Kimura K. Testosterone deficiency causes endothelial dysfunction via elevation of asymmetric dimethylarginine and oxidative stress in castrated rats. *The Journal of Sexual Medicine*, 14(12):1540-1548, 2017.
- Kaufman MJ, Kanayama G, Hudson JI, Pope HGJr. Supraphysiologic-dose anabolic-androgenic steroid use: a risk for dementia? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 100:180-207, 2019.
- Kearney PM, Whelton M, Reynolds P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*, 365: 217-223, 2005.
- Kimura M, Sudhir K, Jones M, Simpson E, Jefferis AM, Chin-Dusting JP. Impaired acetylcholine-induced release of nitric oxide in the aorta of male aromatase-knockout mice: regulation of nitric oxide production by endogenous sex hormones in males. *Circulation Research*, 93(12):1267-1271, 2003.
- Kolasa-Wołoskiuk A, Tarnowski M, Baranowska-Bosiacka I, Chlubek D, Wiszniewska B. Antioxidant enzyme expression of mRNA and protein in the epididymis of finasteride-treated male rat offspring during postnatal development. *Archives of Medical Science: AMS*, 15(3):797, 2019.

- Korkia P, Stimson GV. Indications of prevalence, practice and effects of anabolic steroid use in Great Britain. *International Journal of Sports Medicine*, 18(07):557-562, 1997.
- Kozłowska A, Wojtacha P, Równiak M, Kolenkiewicz M, Tsai ML. Differences in Serum Steroid Hormones Concentrations in Spontaneously Hypertensive Rats (SHR)—an Animal Model of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD). *Physiological Research*, 68(1):25-36, 2019.
- Kurumbail R, Stevens A, Gierse J. *et al.* Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, 384:644–648, 1996.
- Lane HA, Grace F, Smith C, Morris K, Cockcroft J, Scanlon MF, Davies JS. Impaired vasoreactivity in bodybuilders using androgenic anabolic steroids. *European Journal of Clinical Investigation*, 36:438-488, 2006.
- Lee RMKW, Forrest JB, Garfield RE, Daniel EE. Ultrastructural changes in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Journal of Vascular Research*, 20(2):72-91, 1983.
- Lee, RMKW. Vascular changes at the prehypertensive phase in the mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Journal of Vascular Research*, 22(3):105-126, 1985.
- Le Mellay V, Grosse B, Lieberherr M. Phospholipase C β and membrane action of calcitriol and estradiol. *Journal of Biological Chemistry*, 272(18):11902-11907, 1997.
- Littleton-Kearney M, Hurn PD. Testosterone as a modulator of vascular behavior. *Biological Research For Nursing*, 5(4), 2004.
- Liu PY, Death AK, Handelsman DJ. Androgens and cardiovascular disease. *Endocrine reviews*, 24(3):313–40, 2003.

- Lopes RAM, Neves KB, Carneiro FS, Tostes RC. Testosterone and vascular function in aging. *Frontiers in Physiology*, 3, 2012.
- Lüscher TF, Diederich D, Weber E, Vanhoutte PM, Bühler FR. Endothelium-dependent responses in carotid and renal arteries of normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*, 11(6): 573–8, 1988.
- Ma Z, Hung Nguyen T, Hoa Huynh T, Tien Do P, Huynh H. Reduction of rat prostate weight by combined quercetin-finasteride treatment is associated with cell cycle deregulation. *Journal of Endocrinology*, 181(3), 493-508, 2004.
- Manigrasso MB, Sawyer RT, Hutchens ZMJr, Flynn ER, Maric-Bilkan C. Combined inhibition of aromatase activity and dihydrotestosterone supplementation attenuates renal injury in male streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 302(9): F1203-F1209, 2012.
- Manigrasso MB, Sawyer RT, Marbury DC, Flynn ER, Maric C. Inhibition of estradiol synthesis attenuates renal injury in male streptozotocin-induced diabetic rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 301(3):F634-F640, 2011.
- Maranon R, Reckelhoff JF. Sex and gender differences in control of blood pressure. *Clinical Science*, 125:311–318, 2013.
- Marsh JM. The role of cyclic AMP in gonadal steroidogenesis. *Biology of Reproduction*, 14(1):30-53, 1976.
- Martin DS, Biloft S, Redetzke R, Vogel E. Castration reduces blood pressure and autonomic venous tone in male spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, 23(12):2229-2236, 2005.
- Mendelson C, Dufau M, Catt K. Gonadotropin binding and stimulation of cyclic

- adenosine 3',5'-Monophosphate and testosterone production in isolated leydig cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 250(22):8818-8823, 1975.
- Meng X, Li X, Xu X, Li P, Chen Y, Fu X, Xu X. Elevated luteinizing hormone contributes to atherosclerosis formation by inhibiting nitric oxide synthesis via PI3K/Akt pathway. *Vascular Pharmacology*, 121, 106582, 2019.
- Meydan S, Kus I, Tas U, Ogeturk M, Sancakdar E, Dabak DO, Kararsiz I, Sarsilmaz, M. Effects of testosterone on orchietomy-induced oxidative damage in the rat hippocampus. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 40(4), 281-285, 2010.
- Miller WL. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocrine Reviews*, 9(3):295-318, 1988.
- Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Reviews*, 32(1):81-151, 2011.
- Miller WL. Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 379(1-2):62-73, 2013.
- Mishra JS, More AS, Hankins GD, Kumar S. Hyperandrogenemia reduces endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation in mesenteric artery of female rats. *Biology of Reproduction*, 96(6):1221-1230, 2017.
- Mombouli J-V, Bissirou I, Agboton V, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarization factor: a key mediator of the vasodilator action of bradykinin. *Immunopharmacology*, 33:46-50, 1996.
- Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandins and endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, 263:663-665, 1976.
- Moncada S, Higgs EA, Vane JR. Human arterial and venous tissues generate

- prostacyclin (prostaglandin X), a potent inhibitor of platelet aggregation. *The Lancet*, 1:18-20, 1977.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochemical Pharmacology*, 38(11):1709-1715, 1989.
- More AS, Mishra JS, Hankins GD, Yallampalli C, Sathishkumar, K. Enalapril normalizes endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation in mesenteric artery of adult hypertensive rats prenatally exposed to testosterone. *Biology of Reproduction*, 92(6):155-1, 2015.
- Morgentaler A, Traish A. The history of testosterone and the evolution of its therapeutic potential. *Sexual Medicine Reviews*, 1-11, 2018.
- Morita I. Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 68:165-175, 2002.
- Martorell A, Blanco-Rivero J, Aras-Lo'pez R, Sagredo A, Balfago'n G, Ferrer M. Orchidectomy increases the formation of prostanoides and modulates their role in the acetylcholine-induced relaxation in the rat aorta. *Cardiovascular Research*, 77:590–599, 2008.
- Mosca L, Benjamin EJ, Berra K, Bezanson JL, Dolor RJ, Lloyd-Jones DM, Newby LK, Piña IL, Roger VL, Shaw LJ, Zhao D, Beckie TM, Bushnell C, Armiento J, Kris-Etherton PM, Fang J, Ganiats TG, Gomes AS, Gracia CR, Haan CK, Jackson E, Judelson DR, Kelepouris E, Lavie CJ, Moore A, Nussmeier N, Ofili E, Oparil S, Ouyang P, Pinn VW, Sherif K, Smith SC, Sopko G, Chandra-Strobos N, Urbina EM, Vaccarino V, Wenger NK. Effectiveness-based guidelines for the prevention of cardiovascular disease in women - 2001 Update: a guideline from the American heart association. *Circulation*,

123:1243-1262, 2011.

Moysés MR, Barker JA, Cabral AM. Sex hormone modulation of serotonin-induced coronary vasodilation in isolated heart - Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 34:949-958, 2001.

Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. Circulation Research, 41(1):19-26, 1977.

Naor Z, Harris D, Shacham S. Mechanism of GnRH receptor signaling: combinatorial cross-talk of Ca^{2+} and protein kinase C. Frontiers in Neuroendocrinology, 19(1):1-19, 1998.

Naor Z. Signaling by G-protein-coupled receptor (GPCR): studies on the GnRH receptor. Frontiers in Neuroendocrinology, 30(1):10-29, 2009.

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

Nettleship JE, Jones RD, Channer KS, Jones TH. Testosterone and coronary artery disease. Frontiers of Hormone Research, 37:91–107, 2009.

Nieschlag E, Nieschlag S. Testosterone deficiency: a historical perspective. Asian Journal of Andrology, 16(2):161, 2014.

Nieschlag E, Nieschlag S. The history of testosterone and the testes: from antiquity to modern times. In Testosterone. Springer, Cham., 1-19, 2017.

Nieschlag E, Nieschlag S. Endocrine History: The history of discovery, synthesis and development of testosterone for clinical use. European Journal of Endocrinology, 1(aop), 2019.

- Norton GR, Trifunovic B, Woodiwis AJ. Attenuated β -adrenoceptor-mediated cardiac contractile responses following androgenic steroid administration to sedentary rats. *European Journal of Applied Physiology*, 81:310-316, 2000.
- Okamoto K, Aoki Kyuzo. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese Circulation Journal*, 27(3):282-293, 1963.
- Omura T, Morohashi K. Gene regulation of steroidogenesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 53(1-6):19-25, 1995.
- Orshal JM, Khalil RA. Gender, sex hormones, and vascular tone. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286(2):R233-R249, 2004.
- Packer CS. Changes in arterial smooth muscle contractility, contractile proteins, and arterial wall structure in spontaneous hypertension. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 207(2):148-174, 1994.
- Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 33:664-666, 1988.
- Pardridge WM. Serum bioavailability of sex steroid hormones. *Clinics in Endocrinology and Metabolism*, 15:259–278, 1986.
- Payne AH, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine Reviews*, 25(6):947-970, 2004.
- Perret B, Mabile L, Martinez L, Tercé F, Barbaras R, Collet X. Hepatic lipase structure/function relationship, synthesis, and regulation. *Journal of lipid research*, 43(8):1163-1169, 2002.

- Perrett RM, Craig AM. Molecular mechanisms of gonadotropin-releasing hormone signaling: integrating cyclic nucleotides into the network. *Frontiers in Endocrinology*, 4:180, 2013.
- Perusquía M, Contreras D, Herrera N. Hypotestosteronemia is an important factor for the development of hypertension: elevated blood pressure in orchidectomized conscious rats is reversed by different androgens. *Endocrine*, 65:416-425, 2019.
- Perusquía M, Espinoza J, Montañó LM, Stallone JN. Regional differences in the vasorelaxing effects of testosterone and its 5-reduced metabolites in the canine vasculature. *Vascular Pharmacology*, 56(3-4):176-182, 2012.
- Pey A, Saborido A, Blazquez I, Delgado J, Megías A. Effects of prolonged stanozolol treatment on antioxidant enzyme activities, oxidative stress markers, and heat shock protein HSP72 levels in rat liver. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 87(4-5):269-277, 2003.
- Pi M, Zhang L, Lei SF, Huang MZ, Zhu W, Zhang J, Quarles, LD. Impaired osteoblast function in GPRC6A null mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25(5):1092–102, 2010.
- Pi M.; Parril, AL.; Quarles LD. GPRC6A mediates the non-genomic effects of steroids. *The Journal of biological chemistry*, 285(51):39953–64, 2010.
- Pope HGJR, Katz DL, Hudson JI. Anorexia nervosa and “reverse anorexia” among 108 male bodybuilders. *Comprehensive Psychiatry*, 34(6):406-409, 1993.
- Pope HGJr, Gruber AJ, Choi P, Olivardia R, Phillips KA. Muscle dysmorphia: An underrecognized form of body dysmorphic disorder. *Psychosomatics*, 38(6):548-557, 1997.
- Pope HGJr, Kanayama G, Athey ABA, Ryan EBA, Hudson JI, Baggish A. The lifetime prevalence of anabolic-androgenic steroid use and dependence in

americans: current best estimates. *The American Journal of Addictions*, 23(4):371-377, 2014.

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*, 345(1):7–14, 2013.

Qiao X, McConnell KRBS, Khalil RA. Sex steroids and vascular responses in hypertension and aging. *Gender Medicine*, 5:S46-S64, 2008.

Reckelhoff JF, Zhang H, Granger JP. Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 31(2):435-43, 1998.

Reckelhoff JF. Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension*, 37:1199-1208, 2001.

Reckelhoff JF. Gender differences in hypertension. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 27(3):176-181, 2018.

Rhoden EL, Morgentaler A. Treatment of testosterone-induced gynecomastia with the aromatase inhibitor, anastrozole. *International Journal of Impotence Research*, 16(1):95, 2004

Ribeiro Júnior RF, Ronconi KS, Jesus ICG, Almeida PWM, Forechi L, Vassalo DV, Guatimosim S, Stefanon I, Fernandes AA. Testosterone deficiency prevents left ventricular contractility dysfunction after myocardial infarction. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 460:14-23, 2018.

Rolf C, Zitzmann M, Nieschlag E. The aging male and late-onset hypogonadism. In: *Andrology – Male Reproductive Health and Dysfunction*, Springer, 3Ed, 2010.

- Rouvier WN, Delgado NTB, Menezes JB, Santos RL, Moyses MR. Testosterone replacement therapy prevents alterations of coronary vascular reactivity caused by hormone deficiency induced by castration. *PLOS ONE*, 10(8):31, 2015.
- Rowell KO, Hall J, Pugh PJ, Jones TH, Channer KS, Jones RD. Testosterone acts as an efficacious vasodilator in isolated human pulmonary arteries and veins: evidence for a biphasic effect at physiological and supra-physiological concentrations. *Journal of Endocrinological Investigation*, 32(9):718-723, 2009.
- Rubio-Gayosso I, Ramirez-Sanchez I, Ita-Islas I, Ortiz-Vilchis P, Gutierrez-Salmean G, Meaney A, Palma I, Olivares I, Meaney E, Ceballos, G. Testosterone metabolites mediate its effects on myocardial damage induced by ischemia/reperfusion in male Wistar rats. *Steroids*, 78(3):362-369, 2013.
- Rusko J, Li L, Vanbreemen C. 17- β -Estradiol stimulation of endothelial K⁺ channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 214(2):367-372, 1995.
- Ruzicka L, Wettstein A. Über die kristallinische Herstellung des Testikelhormons, Testosteron (Androsten-3-ol-17-ol). *Helvetic Chimica Acta*, 18:1264-1275, 1935.
- Santos RL, Lima JT, Rouvier WN, Moysés MR. Deficiency of sex hormones does not affect 17- β -estradiol-induced coronary vasodilation in the isolated rat heart. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 49, 2016.
- Santos RL, Marin EB, Gonçalves WLS, Bissoli NS, Abreu GR, Moysés MR. Sex differences in the coronary vasodilation induced by 17 β -oestradiol in the isolated perfused heart from spontaneously hypertensive rats. *Acta physiologica*, 200(3):203-210, 2010.

- Sagoe D, Andreassen CS, Pallesen S. The aetiology and trajectory of anabolic-androgenic steroid use initiation: a systematic review and synthesis of qualitative research. *Substance Abuse Treatment, Prevention and Policy*. 9:27, 2014 (A)
- Sagoe DMP, Molde H, Andreassen CS, Torsheim T, Pallesen S. The global epidemiology of anabolic-androgenic steroid use: a meta-analysis and meta-regression analysis. *Annals of Epidemiology*, 24:383-398, 2014 (B).
- Schally AV, Arimura A, Kastin AJ, Matsuo H, Baba Y, Redding TW, Nair RMG, Debeljuk L. Gonadotropin releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science*, 173:1036-1038, 1971.
- Schiffer L, Arlt W, Storbeck, K-H. Intracrine androgen biosynthesis, metabolism and action revisited. *Molecular and cellular endocrinology*, 465:4-26, 2018.
- Schiffrin EL, Deng LY, Larochelle P. Morphology of resistance arteries and comparison of effects of vasoconstrictors in mild essential hypertensive patients. *Clinical and investigative medicine. Medecine Elinique et Experimentale*, 16(3):177-186, 1993.
- Sherbet DP. Peripheral Testosterone Metabolism. In: Payne AH, Hardy MP editors. *The Leydig Cell in Health and Disease*. RiverView Drive, Totowa, New Jersey, 2007.
- Shimokawa H, Morikawa K. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 39(5):725-732, 2005.
- Shimokawa H, Yasutake H, Fujii K, Owada MK, Nakaike R, Fukumoto Y, Tsuneo T, TetsuhikoN, Kensuke E, Masatoshi F, Takeshita, A. The importance of the

- hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 28(5):703-711, 1996.
- Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrinology Reviews*, 15:342-355, 1994.
- Smith AM, Bennett RT, Jones TH, Cowen ME, Channer KS, Jones RD. Characterization of the vasodilatory action of testosterone in the human pulmonary circulation. *Vascular Health and Risk Management*, 4(6):1459-1466, 2008.
- Slezák P. Accurate normalization factor for wire myography of rat femoral artery. *Physiological Research*, 59(6):1033–1036, 2010.
- Somberg LB, Gutterman DD, Miura H, Nirula R, Hatoum OA. Shock associated with endothelial dysfunction in omental microvessels. *European Journal of Clinical Investigation*, 47(1):30-37, 2016.
- Soljancic A, Ruiz AL, Chandrashekar K, Maranon R, Liu R, Reckelhoff JF, Juncos LA. Protective role of testosterone in ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 304(11):R951-R958, 2013.
- Sanford EJ, Paulson DF, Rohner TJ, Drago JR, Santen RJ, Bardin CW. The Effects of Castration on Adrenal Testosterone Secretion in Men with Prostatic Carcinoma. *The Journal of Urology*, 118(6):1019–1021, 1977.
- Stemerman MB, Skidmore IF, O'Brien JR, Smith EB. Vascular injury: platelets and smooth muscle cell response. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 294:217-224, 1981.

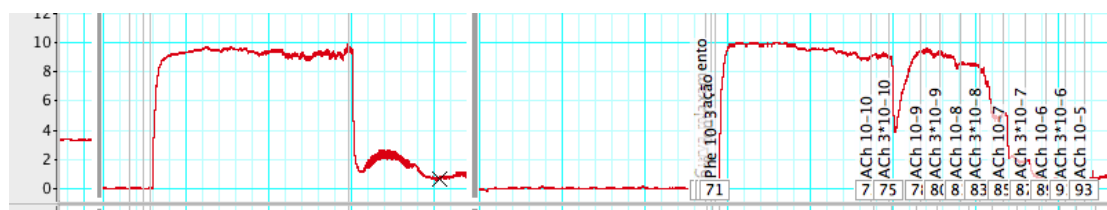
- Stocco C. Tissue physiology and pathology of aromatase. *Steroids*. 77:27–35, 2012.
- Taddei S, Virdis A, Mattei P, Salvetti A. Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension*, 21:929-933, 1993.
- Tatchum-Talom R, Eyster KM, Kost Jr CK, Martin DS. Blood pressure and mesenteric vascular reactivity in SHR seven months after gonadectomy. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 57(3):357-364, 2011.
- Tateson JE, Moncada S, Vane JR. Effects of prostacyclin (PGX) on cyclic AMP concentrations in human platelets. *Prostaglandins*, 13(3):389-397, 1977.
- 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*, 135(3):735–740, 2002.
- Toot JD, Reho JJ, Ramirez RJ, Novak J, Ely DL. Alterations in vasomotor systems and mechanics of resistance-sized mesenteric arteries from SHR and WKY male rats following in vivo testosterone manipulation. *Biology of Sex Differences*, 3(1):1-13, 2012.
- Tyagi V, Scordo M, Yoon RS, Liporace FA, Greene LW. Revisiting the role of testosterone: Are we missing something? *Reviews in Urology*, 19(1):16, 2017.
- Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiologica*, 196(2):193-222, 2009.
- Vanhoutte PM, Shimokawa H, Feletou M, Tang EHC. Endothelial dysfunction and vascular disease—a 30th anniversary update. *Acta physiologica*, 219(1):22-96, 2017.
- Vasan RS, Larson MG, Leip EP, Evans JC, O'Donnell CJ, Kannel WB, Levy D. Impact of High-Normal Blood Pressure on the Risk of Cardiovascular Disease. *New England Journal of Medicine*, 345(18):1291–1297, 2001.

- VII Diretriz Brasileira De Hipertensão Arterial. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. n.3:1-107, 2016.
- Wiggers G, Peçanha FM, Briones M, Pérez-Girón JV, Miguel M, Vassallo DV, Cachoeiro V, Alonso MJ, Salaices M. Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. *American Journal of Physiology Heart Circulation Physiology*, 295:H1033–H1043, 2008.
- Wong ND. Chapter Epidemiology and prevention of cardiovascular disease in Oxford Textbook of Global Public Health, 6 ed., 2017.
- Yanagisawa M, Kiruhara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332:411-415, 1988.
- Yanagisawa M, Masaki T. Endothelial, a novel endothelium-derived peptide. Pharmacological activities, regulation and possible roles in cardiovascular control. *Biochemical Pharmacology*, 38(12):1877-1883, 1989.
- Yu J, Akishita M, Eto M, Ogawa S, Son BK, 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*, 151(4):1822-1828, 2010.
- Zhao J, Liu GL, Wei Y, Jiang LH, Bao PL, Yang QY. Low-dose testosterone alleviates vascular damage caused by castration in male rats in puberty via modulation of the PI3K/AKT signaling pathway. *Molecular medicine reports*, 14(3):2518-2526, 2016.

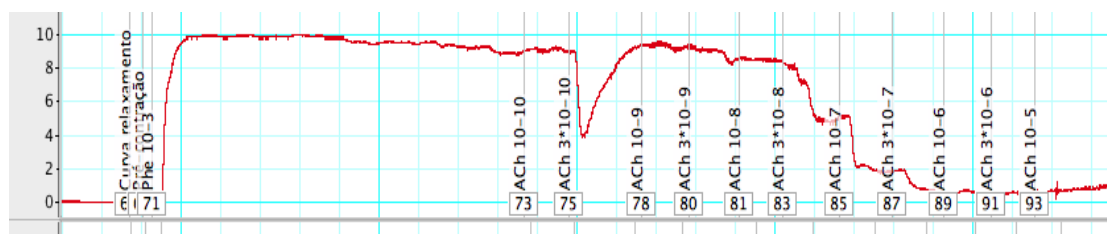
APÊNDICES

APÊNDICE A - Registro típico da reatividade vascular em artéria mesentérica de terceira ordem de ratos do grupo SHAM; (A) primeira curva representativa do teste do endotélio e segunda curva relaxamento à acetilcolina após pré-contracção com fenilefrina; (B) maximização da segunda curva.

A

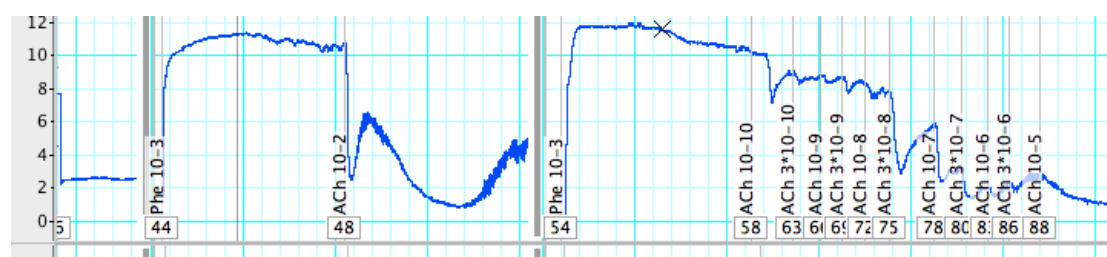


B

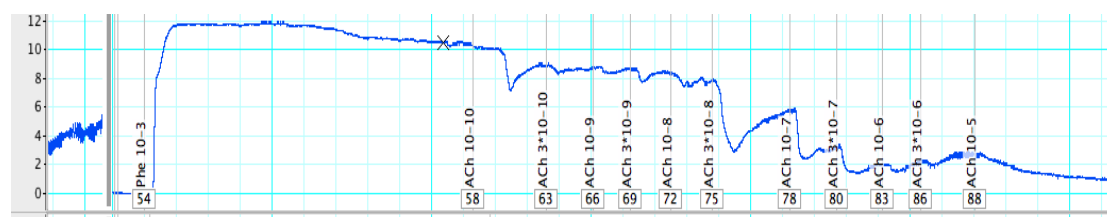


APÊNDICE B - Registro típico da reatividade vascular em artéria mesentérica de terceira ordem de ratos do grupo ORX; (A) primeira curva representativa do teste do endotélio e segunda curva relaxamento à acetilcolina após pré-contracção com fenilefrina; (B) maximização da segunda curva.

A

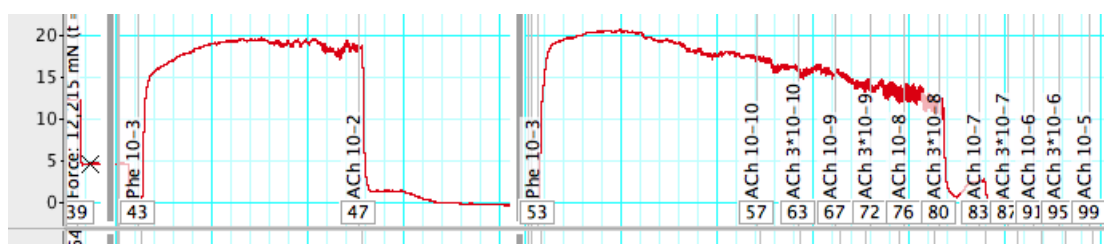


B

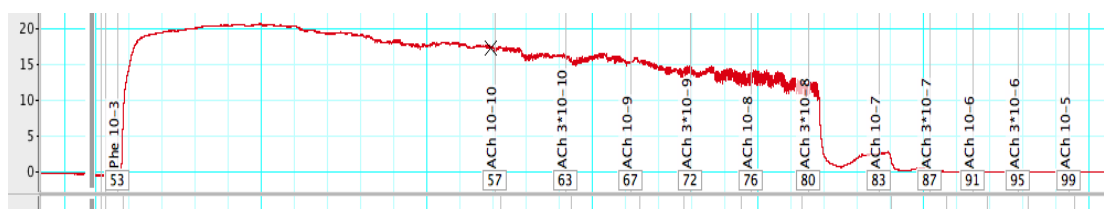


APÊNDICE C - Registro típico da reatividade vascular em artéria mesentérica de terceira ordem de ratos do grupo TTO; (A) primeira curva representativa do teste do endotélio e segunda curva relaxamento à acetilcolina após pré-contracção com fenilefrina; (B) maximização da segunda curva.

A

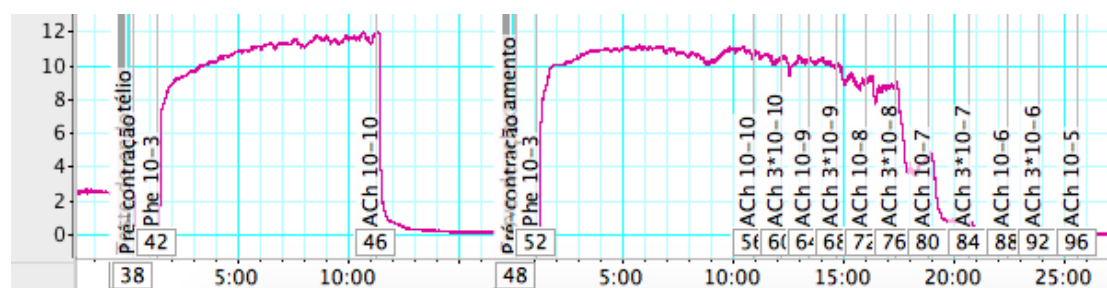


B

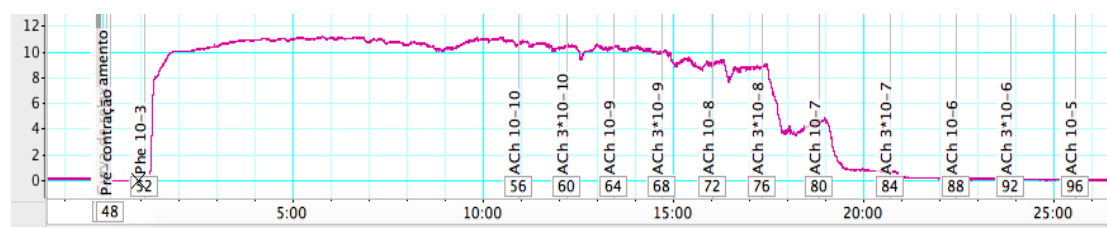


APÊNDICE D - Registro típico da reatividade vascular em artéria mesentérica de terceira ordem de ratos do grupo TTO+ANA; (A) primeira curva representativa do teste do endotélio e segunda curva relaxamento à acetilcolina após pré-contracção com fenilefrina; (B) maximização da segunda curva.

A

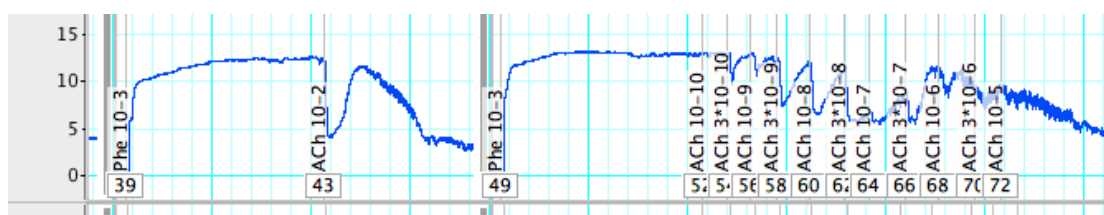


B

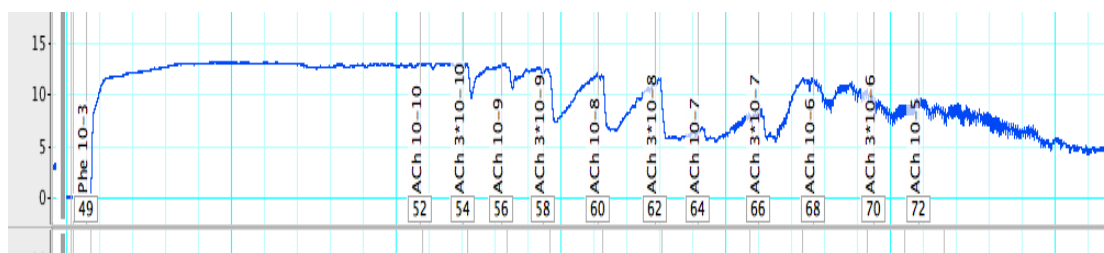


APÊNDICE E - Registro típico da reatividade vascular em artéria mesentérica de terceira ordem de ratos do grupo TTO+FIN; (A) primeira curva representativa do teste do endotélio e segunda curva relaxamento à acetilcolina após pré-contracção com fenilefrina; (B) maximização da segunda curva.

A



B



APÊNDICE F. Fotos representativas da cavidade abdominal dos animais, obtidas no dia da pesagem dos órgãos.

