

CAPÍTULO 16

EFEITOS AGUDOS DA TESTOSTERONA SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR CORONARIANA DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS

MATHEUS ZUCOLLOTO HOMEM¹

JUAN CARLOS ARAPA DIAZ²

JÉSSYCA APARECIDA SOARES GIESEN³

WENDER DO NASCIMENTO ROUVER⁴

ROGER LYRIO DOS SANTOS⁵

¹Discente – Farmácia da Universidade Federal do Espírito Santo

²Discente – Mestrado em Ciências Fisiológicas no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo

³Discente – Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo

⁴Discente – Pós doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo

⁵Docente – Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Espírito Santo

Palavras-chave: Testosterona; Reatividade vascular; Leito coronariano; Hipertensão.

INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCVs), dentre elas a hipertensão e doença arterial coronariana, compreendem a maior causa de morte no mundo, e as estimativas apontavam que a mortalidade por DCVs permaneceria liderando as causas de morte ao longo do século XXI (MURRAY & LOPEZ, 1997). A hipertensão é considerada um dos fatores de risco mais prevalentes para DCVs e cerebrovasculares, tais como, insuficiência cardíaca congestiva, acidente vascular cerebral, doença renal em estágio terminal, doença vascular periférica, comprometimento cognitivo e principalmente a doença coronariana (DREGAN *et al.*, 2012).

Dentre essas doenças, Mansur & Favarato (2012) chamam atenção para taxas elevadas de mortes por DCVs, e destacam maior prevalência de doença cardíaca isquêmica em homens quando comparado com mulheres. Pelo fato de os homens serem mais suscetíveis a eventos cardiovasculares, andrógenos tem sido associada a efeitos deletérios (ADAMS *et al.*, 1995). De fato, estudos apontam que a testosterona pode exercer efeitos sobre o sistema cardiovascular, como por exemplo: Estimular o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (RECKELHOFF *et al.*, 2000), aumentar a expressão de receptores α e β (TSANG *et al.*, 2009) adrenérgicos e modular o metabolismo, estoque, liberação e recaptção de norepinefrina em neurônios simpáticos (SALT, 1972). Além disso, a diminuição da testosterona tem sido associada à melhora no relaxamento dependente do endotélio (HERMAN *et al.*, 1997). Todas essas evidências nos levam a sugerir que a testosterona poderia apresentar efeitos deletérios sobre o sistema cardiovascular.

Embora haja evidências de efeitos deletérios da testosterona sobre o sistema cardiovascular, estudos têm demonstrado que a testosterona po-

de exercer efeitos benéficos sobre esse sistema (LIU *et al.*, 2003; WU & VON ECKARDSTEIN, 2003; TRAISH, 2014). Outros autores têm demonstrado que hipotestosteronemia pode ocasionar diversos malefícios, dentre eles: Diminuição da libido e vitalidade, osteoporose, dentre outras complicações no sexo masculino (GROBER, 2014). Esses efeitos benéficos podem ser considerados inclusive no sexo feminino, uma vez que tem se sugerido que a redução de androgênios nas fêmeas também estaria envolvida no desenvolvimento das DCVs na pós-menopausa (MONTALCINI *et al.*, 2007), mostrando a importância desses hormônios sexuais masculinos na manutenção de um ambiente vascular favorável.

A testosterona, principal andrógeno produzido no sexo masculino, é um hormônio esteroide sintetizado nos testículos (95%) e na zona reticular das glândulas suprarrenais. Parte da testosterona (7%) é reduzida a DHT pela 5α -reductase, e outra parte (cerca de 0,5%) é convertida em E2 pela aromatase (CYP19A1). Cerca de 60% da testosterona circula pelos vasos sanguíneos ligada a uma proteína que exerce alta afinidade pelo esteroide, a SHBG (*sex hormone binding globulin*) e o restante ligado a albumina. No plasma, por volta de 0,5 – 4% da testosterona está na sua forma livre (TYAGI *et al.*, 2017).

As ações clássicas da testosterona (genômicas ou nucleares) se dão pela interação do hormônio com seu receptor específico, o receptor de andrógeno (AR), que é um membro da superfamília de receptores nucleares ativados por ligantes, que uma vez estimulado atua como fator de transcrição (TYAGI *et al.*, 2017). Esses receptores podem ser expressos em células de tecidos que vão desde órgãos reprodutivos, o que inclui as genitálias femininas e masculinas, testículos, vesícula seminal, próstata, dentre outros, a tecidos não relacionados aos órgãos

reprodutivos, como por exemplos: Pele, cartilagem, glândulas sebáceas, músculo cardíaco, células do músculo liso vascular e células endoteliais, dentre outras (LIU *et al.*, 2003).

Dentre as ações não clássicas da testosterona tem sido descrita sua capacidade de atuar na modulação de fatores no sistema cardiovascular (DEENADAYALU *et al.*, 2011). Em anéis de aorta de ratos (BUCCI *et al.*, 2009), porcos (DEENADAYALU *et al.*, 2011) e artéria basilar de cães (RAMÍREZ-ROSAS *et al.*, 2011) a testosterona é capaz de promover relaxamento. Também é conhecido que a testosterona pode modular diretamente o músculo liso vascular de maneira rápida e não-genômica como mostrado em diversos estudos (BUCCI *et al.*, 2009; TOOT *et al.*, 2011; RAMÍREZ-ROSAS *et al.*, 2011; DEENADAYALU *et al.*, 2011; PUTTABYATAPPA *et al.*, 2013). No mais, outros autores também mostram que a testosterona promove vasodilatação em segmentos de artérias coronárias por meio de mudanças no fluxo através de canais iônicos, alterando o fluxo de canais para potássio (TEP-AREENAN *et al.*, 2002; DEENADAYALU *et al.*, 2011) e de canais para cálcio (MONTAÑO *et al.*, 2008).

Além do importante papel da testosterona agindo diretamente sobre os vasos sanguíneos, estudos também têm se empenhado em demonstrar os efeitos da privação da testosterona sobre o sistema cardiovascular. Nesse contexto, é conhecido que a castração, que resulta em baixos níveis de andrógenos, pode diminuir a expressão de canais para potássio em aorta de ratos, ação que é revertida com a reposição do andrógeno (ZHOU *et al.*, 2008). De fato, um recente estudo de nosso laboratório demonstrou que a terapia de reposição com testosterona, preveniu o prejuízo na reatividade vascular dependente do endotélio em coronárias de ratos normotensos provocada pela deficiência hormonal induzida por castração (ROUVER *et al.*, 2015).

Desta forma, sugerindo que a testosterona em níveis fisiológicos, possivelmente, é importante para a manutenção do ambiente vascular.

Em conjunto, esses achados atribuem à testosterona uma possível ação protetora sobre o sistema cardiovascular, entretanto, como mencionado, há estudos que mostram seu potencial efeito deletério. Diante disso, nota-se que os estudos acerca das ações da testosterona não são conclusivos e muitas vezes controversos, o que justifica a realização deste estudo. Além disso, pouco se sabe sobre os efeitos desse hormônio em modelos experimentais utilizando coração isolado. Assim, como hipótese, sugerimos que a testosterona poderia exercer um efeito vasodilatador no leito coronariano de ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

MÉTODO

Animais experimentais

Foram utilizados machos SHR, adultos entre 8 a 10 semanas de idade (150 a 250 g). Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (4 animais por gaiola) que permitiram o livre acesso à ingestão de água e ração, em ambiente com controle de temperatura (20 - 26 °C) e umidade (40 a 60 %) e ciclo claro/escuro de 12 horas. Os cuidados dos animais foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal que estão descritos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os protocolos que foram desenvolvidos no presente estudo foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES) sob número 62/2017.

Grupos experimentais

Os animais foram divididos em dois grupos: SHAM e Orquiectomizados (ORX).

Orquiectomia

Para realização da castração os animais foram anestesiados com a administração de cetamina (70 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg), via intraperitoneal. A cirurgia foi realizada por meio de uma incisão na região da linha mediana da bolsa testicular. Com o testículo exposto, foi realizada a abertura da *tunica vaginalis* e ligadura dos testículos. Ao término, os testículos foram removidos e a bolsa testicular foi suturada. Os animais pertencentes ao grupo controle foram submetidos à cirurgia fictícia (SHAM). Ao final, os animais receberam antibiótico (Enrofloxacin - 2,5% - 0,1 mL - i.m) e analgésico/anti-inflamatório (Flunixin 5% - 0,1 mL - i.m).

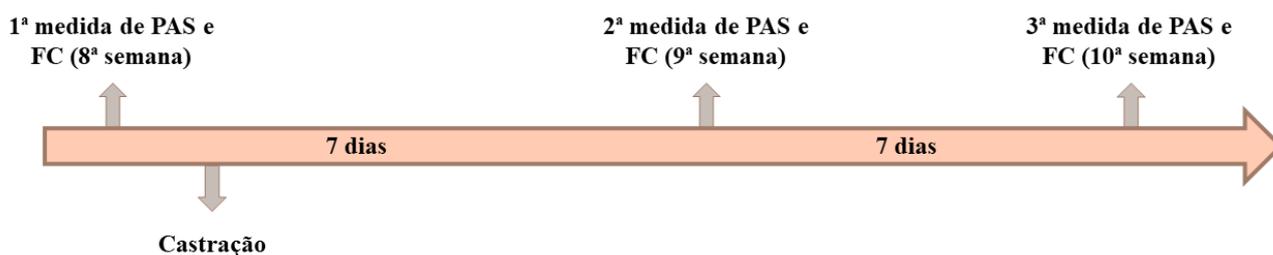
Avaliação não-invasiva da pressão arterial

Antes da obtenção dos dados de pressão arterial, foi necessário um período de adaptação dos animais ao equipamento a ser utilizado por cerca de 10 minutos durante os três dias que

precederam a coleta dos dados, com intuito de minimizar a influência do estresse sobre a pressão arterial. Para aquisição dos dados, os animais foram acomodados em câmara aquecida, dentro de um contentor com um *cuff* de pulso pneumático acoplado na região proximal da cauda. Um esfigmomanômetro foi insuflado e desinsuflado automaticamente e a pressão arterial sistólica (PAS) foi obtido por meio de sinais do transdutor acoplado a um computador.

A temperatura foi controlada entre 29 e 32 °C durante 40 minutos, tempo em que o animal permaneceu no equipamento. Foi obtida a média de três registros com diferença máxima de 10 mmHg, sendo descartados os registros associados às influências causadas por movimentos dos animais. Os registros de pressão arterial foram coletados no dia que antecedeu o procedimento cirúrgico (orquiectomia/SHAM) e uma vez por semana durante 15 dias conforme **Figura 16.1** abaixo.

Figura 16.1 Esquema representativo da realização das medidas de pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC)



Reatividade vascular coronariana

Neste experimento, foi investigada a reatividade vascular do leito coronariano em resposta a doses crescentes de testosterona (10^{-7} a 10^{-4} M) (Propionato, PHARMIC®). Para tanto os animais foram anestesiados com cetamina (70 mg/Kg - i.p.) e xilazina (10 mg/Kg - i.p.), o tórax foi aberto, o coração exposto foi dissecado de suas conexões e rapidamente transfe-

rido para o aparelho de perfusão isolada por meio da canulação da aorta, ao nível de sua curvatura. Em seguida, a perfusão retrógrada foi realizada pelo método de Langerdorff modificado e foi utilizada uma solução nutritora composta de NaCl, 120 mM; CaCl₂ 2H₂O, 1,25 mM; KCl, 5,4 mM; MgSO₄ .7H₂O, 2,5 mM; NaH₂PO₄.H₂O, 2,0 mM; NaHCO₃, 27,0 mM; Na₂SO₄, 1,2 mM; EDTA, 0,03 mM e glicose

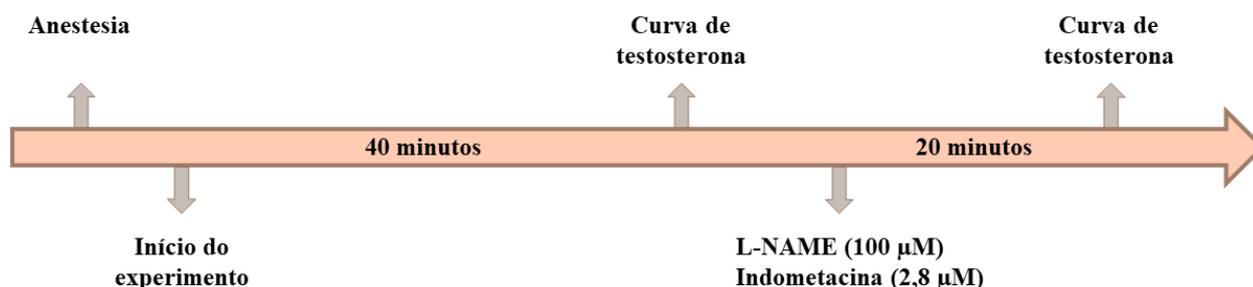
11,0 mM, mantida a 37 °C por meio de um banho-maria, e continuamente pressurizada por mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂) na câmara de saturação, com pH estável em 7,4. O fluxo coronariano foi mantido constante em 10 mL/min por uma bomba de rolete (Hugo Sachs, Germany). A pressão de perfusão coronariana (PPC) basal foi avaliada por meio de um transdutor de pressão (TPS-2 Statham, Incor, São Paulo, SP, Brasil), conectado imediatamente próximo da cânula de perfusão aórtica, através da qual o leito coronariano foi perfundido, ligado a um sistema digital de aquisição de dados (PowerLab System). A eutanásia ocorreu durante o protocolo experimental quando o coração foi removido de suas conexões, com o animal anestesiado.

Para leitura dos registros obtidos pelo sistema de aquisição de dados foi utilizado software LabChart 7.3.1 (Copyright © 1994-2011 ADInstruments). Como o fluxo foi mantido constante em 10 mL/min, por meio da bomba de rolete, as alterações da PPC puderam ser relacionadas às mudanças na resistência vascular. A pressão isovolumétrica do ventrículo esquerdo foi mantida por meio de um balão de látex

que, ainda vazio, foi inserido no interior do ventrículo esquerdo por meio de uma cânula de aço conectada a um transdutor de pressão (TPS-2 Statham, Incor, São Paulo, SP, Brasil). Uma vez no interior do ventrículo esquerdo, o balão foi pressurizado, com água, com auxílio de uma seringa de vidro de forma a manter uma pressão diastólica intraventricular de 10 mmHg.

Após 40 minutos de estabilização da preparação de coração isolado, a PPC basal foi determinada e deu-se início ao estudo da reatividade coronariana por meio da construção de uma curva dose-resposta à testosterona administrada *in bolus* (0,1 mL) em concentrações crescentes (10⁻⁷ – 10⁻⁴ M) antes e após a perfusão com inibidores da síntese do NO com com N^o-nitro-L-Arginina- Metil Éster (L-NAME-inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase-NOS) e da formação dos prostanoídes com Indometacina (inibidor não seletivo da ciclooxigenase - COX) conforme protocolo experimental (**Figura 16.2**). A testosterona foi diluída em DMSO (dimetilsulfóxido) e a concentração final do DM SO na solução que perfundiu o coração foi < 0,01%.

Figura 16.2 Esquema representativo do protocolo experimental de reatividade vascular



Protocolos experimentais

1º Protocolo

Com objetivo de avaliar a participação do óxido nítrico (NO) na resposta vasodilatadora à testosterona, curva dose resposta de testoste-

rona (10⁻⁷ – 10⁻⁴ M) foi realizada antes e após a inibição da enzima NOS com L-NAME (100 µM), o qual foi adicionado à solução de perfusão durante 20 minutos antes que a curva de testosterona seja repetida.

2º Protocolo

Com objetivo de avaliar a participação dos prostanoídeos na resposta vasodilatadora à testosterona, curva dose resposta de testosterona (10^{-7} – 10^{-4} M) foi realizada antes e após a inibição da enzima COX com indometacina (2,8 μ M), a qual foi adicionada à solução de perfusão durante 20 minutos antes que a curva de testosterona seja repetida.

Análise estatística

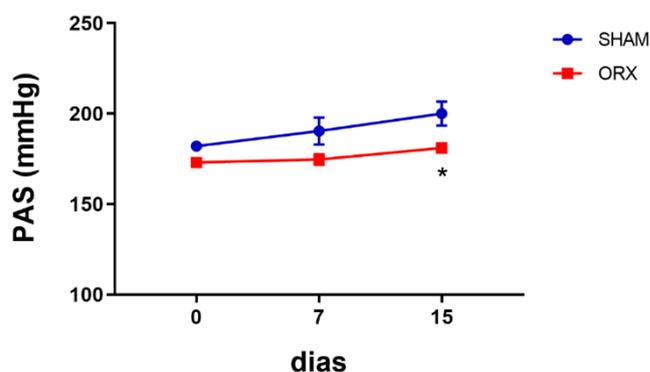
A análise dos dados foi realizada pelo programa estatístico Graph-PadPrism 8. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise da PPC foi realizada por meio de *Student's t test*. Para a análise da PAS, frequência cardíaca (FC) e resposta vasodilatadora à testosterona foi utilizada análise de variância de duas vias (*two-way ANOVA*). Para verificar entre quais grupos ocorreram diferenças foi utilizado o teste *post hoc* Bonferroni, e foi considerado como significativo o valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após análise da pressão arterial sistólica (PAS), de acordo com a **Figura 16.3**, podemos observar que não houve alteração neste parâmetro no decorrer dos 15 dias de observação (SHAM, 182 ± 2 para 200 ± 7 mmHg; ORX, 173 ± 1 para 181 ± 2 mmHg). Contudo, no 15º dia, os ratos do grupo ORX apresentaram uma PAS menor quando comparado ao grupo SHAM (ORX, 181 ± 2 vs. 200 ± 7 mmHg).

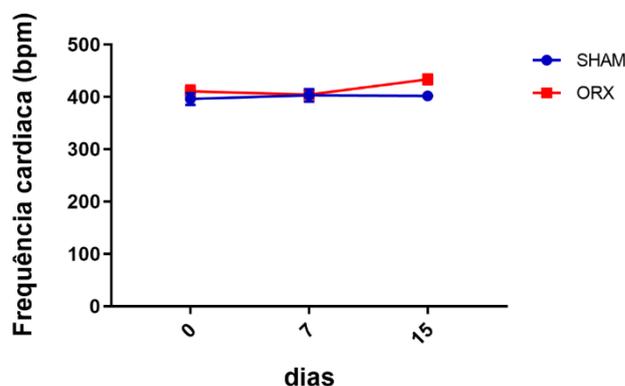
Ao observar a frequência cardíaca (FC) nos grupos, mesmo após 15 dias (**Figura 16.4**), ambos não apresentaram alteração (SHAM, 396 ± 11 para 402 ± 9 BPM; ORX, 410 ± 11 para 433 ± 9 BPM).

Figura 16.3 Pressão arterial sistólica em SHR. SHAM (n = 10), ORX (n = 12). Os dados foram expressos como média \pm EPM. Utilizamos análise de variância de duas vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. * $p < 0.05$ vs. SHAM dia 15



Fonte: Dados obtidos no Laboratório de Endocrinologia e Reatividade Vascular (LABERV), do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

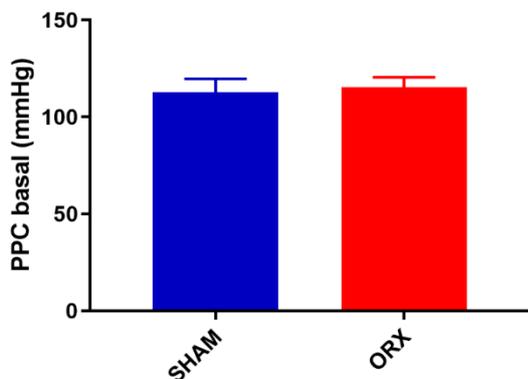
Figura 16.4 Frequência cardíaca em SHR. SHAM (n = 10), ORX (n = 12). Os dados foram expressos como média \pm EPM. Utilizamos análise de variância de duas vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni.



Fonte: Dados obtidos no Laboratório de Endocrinologia e Reatividade Vascular (LABERV), do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Como podemos observar (**Figura 16.5**), a PPC basal em ratos SHR não foi diferente entre os grupos estudados (SHAM, 113 ± 7 ; ORX, 115 ± 5 mmHg).

Figura 16.5 Pressão de perfusão coronariana basal em SHR. SHAM (n = 10), ORX (n = 12). Os dados foram expressos como média ± EPM. Foi usado *Student's t test* não pareado



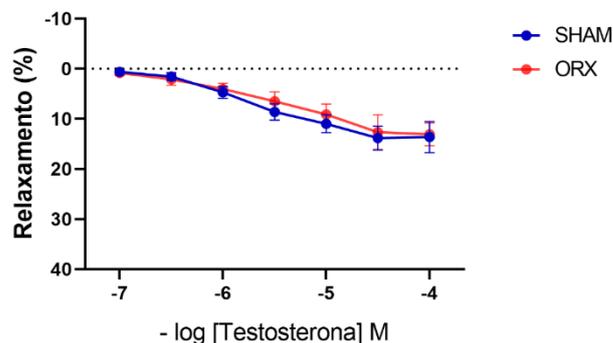
Fonte: Dados obtidos no Laboratório de Endocrinologia e Reatividade Vascular (LABERV), do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Após verificada a PPC basal, a curva de relaxamento induzida pela testosterona foi padronizada e pudemos observar que, no leito vascular coronariano de ratos SHR, a testosterona foi capaz de promover relaxamento dose dependente (**Figura 16.6**), e essa resposta se manteve mesmo após a orquiectomia (SHAM 13,6 ± 3,1 e ORX 13 ± 2,2 %).

Uma vez observada a capacidade vasodilatadora da testosterona nas coronárias de ratos SHR, nossa tentativa foi verificar os mecanismos envolvidos nessa resposta. A **Figura 16.7 A e C**, representam a curva dose resposta à testosterona mediante inibição não seletiva da pro-

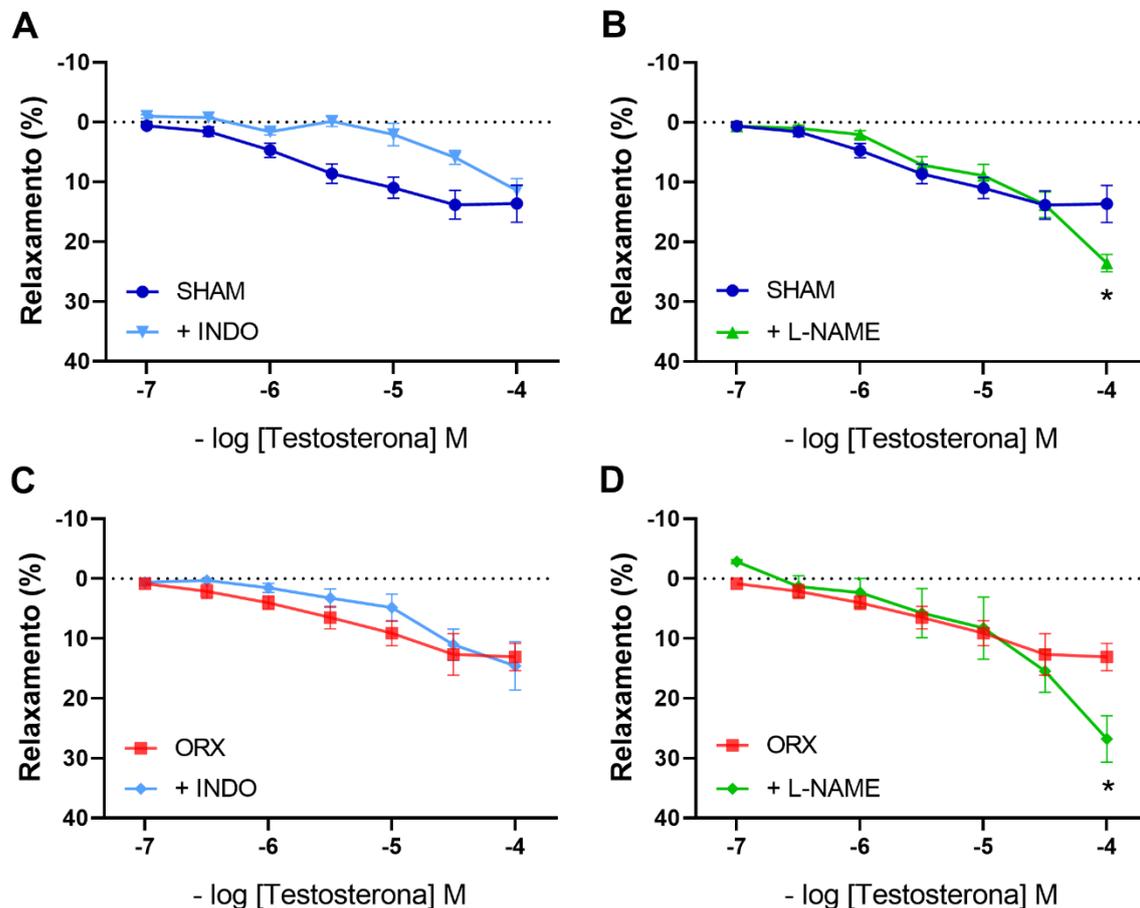
dução dos prostanoídes (com Indometacina) e a **Figura 16.7 B e D** frente a inibição enzimática da enzima óxido nítrico sintase (com L-NAME), tanto em animais SHAM quanto ORX. Em ambos os grupos os metabólitos da ciclooxigenase parecem não estar envolvidos na resposta vasodilatadora à testosterona (SHAM: 13,6 ± 3,1 para 11,4 ± 2 %; ORX: 13 ± 2,2 para 14,5 ± 4 %). Por outro, lado a inibição da formação do NO possibilitou um maior relaxamento a testosterona tanto em animais SHAM (13,6 ± 3,1 para 23,5 ± 1,4 %) quanto ORX (13 ± 2,2 para 26,7 ± 4 %) na última dose.

Figura 16.6 Curva de relaxamento à testosterona (10^{-7} - 10^{-4} M) em SHR. Grupo SHAM (n = 7) e ORX (n = 7). Os dados foram expressos como média ± EPM. Utilizamos análise de variância de duas vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni



Fonte: Dados obtidos no Laboratório de Endocrinologia e Reatividade Vascular (LABERV), do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Figura 16.7 Curva de relaxamento à testosterona (10^{-4} a 10^{-7} M) em SHR. Grupo SHAM na presença de Indometacina (A, n = 3) e L-NAME (B, n = 3); e ORX na presença de Indometacina (C, n = 5) e L-NAME (D, n = 3). Os dados foram expressos como média \pm EPM. Utilizamos análise de variância de duas vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SHAM



Fonte: Dados obtidos no Laboratório de Endocrinologia e Reatividade Vascular (LABERV), do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

O principal achado do nosso estudo foi que a testosterona apresentou efeito vasodilatador no leito vascular coronariano de ratos SHR e esse efeito parece não ser prejudicado pela gonadectomia. Além disso, a vasodilatação observada em ambos os grupos parece ser mediada, pelo menos em parte, por fatores endoteliais.

Nossa primeira observação foi que ao longo dos 15 dias a PAS dos animais SHAM e ORX não apresentou diferença estatística. É conhecido na literatura que a PAS de animais SHR aumenta de acordo com a idade e se estabiliza por volta de 15 semanas de vida (OKAMOTO

& AOKI, 1963). Essa progressão na pressão arterial, possivelmente não foi observada em nosso experimento devido ao pouco tempo proposto de avaliação (15 dias). Contudo, após 15 dias, observamos que a PAS dos animais ORX foi menor quando comparado aos animais SHAM. Uma possível explicação para essa diferença pode estar relacionada ao sistema renina angiotensina (RAS). A estimulação do sistema renina angiotensina que ocorre nos animais SHR machos pela testosterona, contribui com o estresse oxidativo e maior liberação de espécies reativas nesses animais (FORTEPI-

ANI & RECKELHOFF, 2005). As espécies reativas, como por exemplo o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), podem promover vasoconstrição ou mesmo prejudicar a formação de compostos vasodilatores (ZOU *et al.*, 2002), o que poderia promover um aumento na PAS. Essa relação da testosterona com a modulação dos valores pressóricos em SHR também pode ser observado por outros trabalhos (RECKELHOFF *et al.*, 2000). Embora tenhamos encontrado essa alteração em relação a PAS, o mesmo não aconteceu com a FC.

Nossos resultados demonstraram que o hipogonadismo, dado pela orquiectomia, não alterou a PPC basal nos grupos estudados. Esses achados se assemelham a dados prévios encontrados em nosso laboratório onde a castração também não alterou a PPC basal em machos normotensos (ROUVER *et al.*, 2015). Embora os andrógenos em concentrações fisiológicas pareçam não modular a PPC basal, o principal objetivo desse estudo foi avaliar reatividade vascular coronariana frente a administração aguda de testosterona.

Após a administração aguda de testosterona, nossos resultados revelaram que a testosterona foi capaz de modular o tônus vascular coronariano, promovendo um efeito vasodilatador dose dependente. Nossos dados estão de acordo com dados da literatura que demonstraram que a testosterona pode exercer efeitos vasculares rápidos (extranucleares), dentre eles: O relaxamento do leito mesentérico de ratos normotensos (PUTTABYATAPPA *et al.*, 2013) e de segmentos mesentéricos (TOOT *et al.*, 2011) em ratos hipertensos, relaxamento de anéis aórticos em ratos hipertensos (BUCCI *et al.*, 2009) e em suínos normotensos (DEENADAYALU *et al.*, 2011) e relaxamento da artéria basilar em cães normotensos (RAMÍREZ-ROSAS *et al.*, 2011). No presente estudo, mesmo em animais orquiectomizados, a testosterona promoveu relaxa-

mento vascular de artérias coronárias semelhantes às encontradas nos animal SHAM. Uma vez que o tempo de castração proposto no presente trabalho (15 dias) não foi suficiente para se observar prejuízos no relaxamento à testosterona, nossa sugestão é que as alterações dadas pela diminuição do nível circulante de testosterona podem ser tempo dependente. De todo modo, esses dados se diferem dos encontrados em animais normotensos, uma vez que já foi demonstrado por nosso laboratório que 15 dias de castração promoveu prejuízo no relaxamento dependente do endotélio desses animais (ROUVER *et al.*, 2015).

Depois de verificada a capacidade de relaxamento induzido pela testosterona, analisamos as possíveis vias endoteliais nesta resposta no leito coronariano de ratos, haja vista que tem sido demonstrado que a testosterona pode atuar por meio de mecanismos dependentes do endotélio (TEP-AREENAN *et al.*, 2002), de modo que, dependendo da concentração, a testosterona pode promover a liberação de fatores endoteliais (ROUVER *et al.*, 2015). Para tanto, utilizados inibidores não seletivos tanto para a formação de NO pela NOS quanto para a formação de metabólitos vasoativos da COX. Após inibição da formação do prostanoídes, o relaxamento promovido pela testosterona não foi alterado em ambos os grupos, SHAM e ORX, sugerindo que estes metabólitos parecem não estar envolvidos nessa resposta.

Ao analisar a participação do NO na vasodilatação induzida pela testosterona, observamos que o efeito vasodilatador da testosterona, curiosamente, foi maior após uso de um inibidor não seletivo da NOS (L-NAME) tanto em animais SHAM quanto ORX. Sabe-se que a testosterona pode modular a expressão de enzimas como eNOS (SKOGASTIERNA *et al.*, 2014). Além disso, Puttabyatappa *et al.* (2013) demonstraram que a testosterona é capaz de esti-

mular a produção de NO em artérias mesentéricas de segunda ordem. O NO é um importante mediador endotelial sintetizado a partir da NOS e uma vez sintetizado, se difunde para o músculo liso vascular, onde estimula uma cascata de componentes que resultam no relaxamento vascular (FÖRSTERMANN & SESSA, 2012). Desta forma, uma vez que inibimos a via de formação de NO, vasodilatadora, esperaríamos que ao administrar a testosterona a respostas fosse, pelo menos em parte, diminuída. No entanto, a diminuição da formação do NO em nosso modelo melhorou o relaxamento das artérias coronárias. Este resultado sugere que a via de formação do NO pode modular o relaxamento induzido pela testosterona, porém de uma forma negativa, uma vez que após a inibição da sua formação, a vasodilatação induzida pela testosterona foi aumentada. Uma possível explicação para este resultado envolve a formação de $O_2^{\cdot-}$. Já é conhecido que animais hipertensos tem uma produção de espécies reativas, tais como $O_2^{\cdot-}$, que pode ser proveniente de disfunção endotelial (ZOU *et al.*, 2002). A testosterona, por sua vez, pode estimular tanto a liberação de NO (PUTTABYATAPPA *et al.*, 2013) quanto a formação $O_2^{\cdot-}$ (CHIGNALIA *et al.*, 2012). Assim, o $O_2^{\cdot-}$ pode se ligar ao NO e pro-

mover a formação de outras espécies reativas (Como por exemplo: Peroxinitrito) (ZOU *et al.*, 2002) que além de diminuir a biodisponibilidade do NO, que é prejudicial ao relaxamento vascular (KNOCK *et al.*, 2009). Dessa forma, com a inibição da produção do NO, necessário para formar o peroxinitrito que pode atuar como vasoconstritor, o relaxamento pela testosterona ficaria potencializado. Assim, nós acreditamos que a testosterona pode estimular a síntese de NO, resultando na formação de peroxinitrito, que por sua vez pode agir prejudicando o relaxamento dependente do endotélio. Nesse contexto, a ausência de NO (Dada pela inibição com L-NAME) permitiu que o efeito da testosterona fosse aumentado.

CONCLUSÃO

A testosterona apresenta efeito vasodilatador no leito vascular coronariano de ratos SHR e esse efeito parece não ser prejudicado pela gonadectomia. Este efeito parece envolver a modulação da formação do NO bem como de outros mediadores endoteliais, uma vez que as interações farmacológicas realizadas neste estudo não aboliram o relaxamento vascular. Por fim, parte da ação vasodilatadora da testosterona pode ocorrer por ações diretas sobre o músculo liso vascular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M.R. *et al.* Effects of androgens on coronary artery atherosclerosis and atherosclerosis-related impairment of vascular responsiveness. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 15, p. 562-570, 1995. doi: doi.org/10.1161/01.ATV.15.5.562.

BUCCI, M. *et al.* Hydrogen sulphide is involved in testosterone vascular effect. *European Urology*, v. 56, p. 378-384, 2009. doi: 10.1016/j.eururo.2008.05.014.

CHIGNALIA, A.Z. *et al.* Testosterone induces vascular smooth muscle cell migration by NADPH oxidase and c-Src-dependent pathways. *Hypertension*, v. 59, p. 1263-1271, 2012. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.180620.

DEENADAYALU, V. *et al.* Testosterone-induced relaxation of coronary arteries: Activation of BKCa channels via the cGMP-dependent protein kinase. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 302, p. H115-H123, 2011. doi: 10.1152/ajpheart.00046.2011.

DREGAN, A. *et al.* Cardiovascular risk factors and cognitive decline in adults aged 50 and over: A population-based cohort study. *Age and Ageing*, v. 42, p. 338-345, 2012. doi: doi.org/10.1093/ageing/afs166.

FÖRSTERMANN, U. & SESSA, W.C. Nitric oxide synthases: Regulation and function. *European Heart Journal*, v. 33, p. 829-837, 2012. doi: 10.1093/eurheartj/ehs304.

FORTEPIANI, L.A. & RECKELHOFF, J.F. Role of oxidative stress in the sex differences in blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, v. 23, p. 801-805, 2005. doi: 10.1097/01.hjh.0000163149.05083.13.

GROBER, E. Testosterone deficiency and replacement: Myths and realities. *Canadian Urological Association Journal*, v. 8, p. S145, 2014. doi: 10.5489/cuaj.2309.

HERMAN, S.M. *et al.* Androgen deprivation is associated with enhanced endothelium-dependent dilatation in adult men. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 17, p. 2004-2009, 1997. doi: 10.1161/01.atv.17.10.2004.

KNOCK, G.A. *et al.* Superoxide constricts rat pulmonary arteries via Rho-kinase-mediated Ca²⁺ sensitization. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 46, p. 633-642, 2009. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.015.

LIU, P.Y. *et al.* Androgens and cardiovascular disease. *Endocrine Reviews*, v. 24, p. 313-340, 2003. doi: 10.1210/er.2003-0005.

MANSUR, A.P. & FAVARATO, D. Mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil e na região metropolitana de São Paulo: Atualização 2011. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. v. 99, p. 755- 761, 2012. doi: doi.org/10.1590/S0066-782X2012005000061.

MONTALCINI, T. *et al.* Endogenous testosterone and endothelial function in postmenopausal women. *Coronary Artery Disease*, v. 18, p. 9-13, 2007. doi: 10.1097/01.mca.0000236290.79306.d1.

MONTAÑO, L.M. *et al.* Relaxation of androgens on rat thoracic aorta: Testosterone concentration dependent agonist/antagonist L-type Ca²⁺ channel activity, and 5 β -dihydrotestosterone restricted to L-type Ca²⁺ channel blockade. *Endocrinology*, v. 149, p. 2517-2526, 2008. doi: 10.1210/en.2007-1288.

MURRAY, C.J.L. & LOPEZ, A.D. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020: Global burden of disease study. *The Lancet*, v. 349, p. 1498-1504, 1997. doi: doi.org/10.1016/S0140-6736(96)07492-2.

OKAMOTO, K. & AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese Circulation Journal*, v. 27, p. 282-293, 1963. doi: 10.1253/jcj.27.282.

PUTTABYATAPPA, Y. *et al.* Peroxynitrite mediates testosterone-induced vasodilation of microvascular resistance vessels. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 345, n. 1, p. 7-14, 2013. doi: 10.1124/jpet.112.201947.

RAMÍREZ-ROSAS, M.B. *et al.* Pharmacological evidence that Ca²⁺ channels and, to a lesser extent, K⁺ channels mediate the relaxation of testosterone in the canine basilar artery. *Steroids*, v. 76, p. 409-415, 2011. doi: 10.1016/j.steroids.2010.12.012.

RECKELHOFF, J.F. *et al.* Gender differences in development of hypertension in spontaneously hypertensive rats: Role of the renin-angiotensin system. *Hypertension*, v. 35, p. 480-483, 2000. doi: doi.org/10.1161/01.HYP.35.1.480.

ROUVER, W.N. *et al.* Testosterone replacement therapy prevents alterations of Coronary vascular reactivity caused by hormone deficiency induced by castration. *PloS one*, v. 10, p. e0137111, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0137111.

SALT, P.J. Inhibition of noradrenaline uptake₂ in the isolated rat heart by steroids, clonidine and methoxylated phenylethylamines. *European Journal of Pharmacology*, v. 20, p. 329-340, 1972. doi: 10.1016/0014-2999(72)90194-x.

SKOGASTIERNA, C. *et al.* A supraphysiological dose of testosterone induces nitric oxide production and oxidative stress. *European Journal of Preventive Cardiology*, v. 21, p. 1049-1054, 2014. doi: 10.1177/2047487313481755.

TEP-AREENAN, P. *et al.* Testosterone-induced vasorelaxation in the rat mesenteric arterial bed is mediated predominantly via potassium channels. *British Journal of Pharmacology*, v. 135, p. 735-740, 2002. doi: 10.1038/sj.bjp.0704522.

TOOT, J.D. *et al.* Testosterone increases myogenic reactivity of second-order mesenteric arteries in both defective and normal androgen receptor adult male rats. *Gender Medicine*, v. 8, p. 40-52, 2011. doi: 10.1016/j.genm.2011.01.002.

TRAISH, A.M. *et al.* Long-term testosterone therapy in hypogonadal men ameliorates elements of the metabolic syndrome: An observational, long-term registry study. *International Journal of Clinical Practice*, v. 68, p. 314-329, 2014. doi: 10.1111/ijcp.12319.

TSANG, S. *et al.* Testosterone-augmented contractile responses to α 1- and β 1-adrenoceptor stimulation are associated with increased activities of RyR, SERCA, and NCX in the heart. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, v. 296, p. C766-C782, 2009. doi: doi.org/10.1152/ajpcell.00193.2008.

TYAGI, V. *et al.* Revisiting the role of testosterone: Are we missing something? *Reviews in Urology*, v. 19, p. 16-24, 2017. doi: 10.3909/riu0716.

WU, F.C.W. & VON ECKARDSTEIN, Arnold. Androgens and coronary artery disease. *Endocrine Reviews*, v. 24, p. 183-217, 2003. doi: 10.1210/er.2001-0025.

ZHOU, P. *et al.* Testosterone deprivation by castration impairs expression of voltage-dependent potassium channels in rat aorta. *European Journal of Pharmacology*, v. 593, p. 87-91, 2008. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.07.014.

ZOU, M.H. *et al.* Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 109, p. 817-826, 2002. doi: 10.1172/JCI14442.