

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP
Instituto de Biociências – Departamento de Farmacologia
Campus de Botucatu

Patrícia de Souza Rossignoli

***Efeito da orquidectomia e da reposição com testosterona
sobre as respostas vasomotoras de veias isoladas de rato
a agonistas simpatomiméticos***

Botucatu/SP
2009

Patrícia de Souza Rossignoli

***Efeito da orquidectomia e da reposição com testosterona
sobre as respostas vasomotoras de veias isoladas de rato
a agonistas simpatomiméticos***

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Farmacologia)

Orientador: Prof. Dr. Oduvaldo Câmara Marques Pereira

Co-Orientador: Prof. Dr. Agnaldo Bruno Chies

Botucatu/SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Rossignoli, Patrícia de Souza.

Efeito da orquidectomia e da reposição com testosterona sobre as respostas vasomotoras de veias isoladas de rato a agonistas simpatomiméticos / Patrícia de Souza Rossignoli. – Botucatu : [s.n.], 2009

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2009.

Orientador: Prof. Dr. Oduvaldo Câmara Marques Pereira

Co-orientador: Prof. Dr. Agnaldo Bruno Chies

Assunto CAPES: 21000000

1. Farmacologia. 2. Testosterona. 3. Hormônios.

CDD 615.35

Palavras chave: Orquidectomia; Simpatomiméticos; Testosterona; Veia cava; Veia porta.

Dedicatória

Aos meus pais, Cidinha e Reinaldo, por serem os meus grandes incentivadores e por me ensinarem o significado da honestidade e perseverança.

À minha irmã Jaqueline, por todos os momentos que passamos juntas, fazendo na minha vida uma grande e maravilhosa diferença.

Ao meu namorado Marcus, por todo amor e companheirismo a mim dedicados, me fazendo acreditar que existem pessoas as quais realmente se importam conosco.

Agradecimentos Especiais

A Deus

Por todos os momentos maravilhosos, que sempre me impulsionaram a seguir em frente, e também pelos momentos tristes, os quais tem me feito crescer e valorizar ainda mais este presente que é a vida.

Ao Orientador, Prof. Oduvaldo

Por depositar em mim e no Prof. Agnaldo a confiança necessária para o desenvolvimento deste trabalho e por estar sempre disponível, mesmo à distância, auxiliando na resolução de problemas burocráticos e transmitindo seus conhecimentos, seja através do esclarecimento de dúvidas ou pelo fornecimento de valiosas sugestões.

Ao Co-Orientador, Prof. Agnaldo

Por generosamente ter me recebido em seu laboratório e por toda orientação, apoio e atenção fornecidas durante o desenvolvimento deste trabalho e, principalmente, pelo incentivo constante, pela crença em minha capacidade e pelas oportunidades de crescimento pessoal e profissional a mim oferecidas.

À professora e amiga Cristiane

Por ser uma daquelas pessoas raras com um objetivo único de dar alegrias àqueles que lhe cercam, por me fazer sentir como é bom ter amigos em quem podemos confiar, por me apoiar e me acolher com tanto carinho em todos os momentos e pela sua energia positiva que sempre me faz superar obstáculos e vencer.

Agradecimentos

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da FAMEMA, Alisson e Paulo, pelo auxílio na execução dos experimentos, bem como na obtenção e manutenção os animais.

Às funcionárias do Departamento de Farmacologia da FAMEMA, Célia, D. Cida e Simone, por todo auxílio em minhas tarefas diárias, pelas palavras de força e também pelos momentos de descontração.

Aos demais professores de Farmacologia da FAMEMA, Prof. Dr. Carlos Alberto Lazarini e Prof. Dr. Osni Lázaro Pinheiro, que sempre estiveram dispostos a me ajudar.

À Profa. Dra. Márcia Esperança, por ter me dado permissão para a utilização do Laboratório de Biologia Molecular da FAMEMA, e ao técnico Rodrigo, pela convivência em muitas manhãs durante esses dois anos.

À funcionária Lígia do Laboratório de Citogenética da FAMEMA, pelos auxílios técnicos.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu, Cris, Paulão e Luís, pela prontidão em me ajudar sempre que precisei.

Aos funcionários da Secretaria da Pós-Graduação do Instituto de Biociências de Botucatu, Luciene, Maria Helena, Sérgio e Herivaldo, pela paciência e boa vontade no esclarecimento de dúvidas e resolução de todas as questões burocráticas ao longo desses dois anos.

Às bibliotecárias da FAMEMA e UNESP de Botucatu, pelo auxílio no serviço de comutação, referências bibliográficas, normas ABNT e elaboração da ficha catalográfica.

À Prof. Dra. Eunice Oba, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, pelo auxílio na primeira dosagem de testosterona.

Aos Profs. do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu, pelas disciplinas ministradas que tanto contribuíram para a minha formação.

À CAPES e à FAPESP, pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos familiares, especialmente aos padrinhos Mary e Arnaldo, pelo apoio constante em todos os momentos da minha vida.

Às amigas de laboratório, de festas e principalmente de coração, Andréa e Thaís, por todo o companheirismo durante estes dois anos e que hoje, mesmo distantes, continuam torcendo por mim.

À Denise, que me socorreu com um lugar para ficar logo que cheguei em Botucatu.

À minha grande amiga Cynthia, que me acolheu de braços abertos em seu apartamento ainda no primeiro ano de mestrado, que me fez entender por que "o sol é um veneno", que um bom papo e belas risadas substituem sim uma noite de sono, e que "misericórdia" é uma palavra que se encaixa perfeitamente em algumas situações!

À minha grande amiga Renata, que passou a "cuidar de mim" depois que a Cynthia foi embora, me oferecendo casa, carona, ombro amigo, ajuda para desenvolver meu projeto e resolver questões burocráticas. Sem esquecer do seu marido Daniel, pois juntos me proporcionaram ótimos momentos de descontração, e por que não lembrar, ótimas pizzas (de calabresa, é claro!).

Aos muitos outros amigos que fiz em Botucatu, Michele, Juliana, Fernanda, Vanessa, Ricardo, Celso, Danielle, Karen, Carina e Leandro, que sempre me ajudaram em tudo que precisei, me ofereceram suas casas, caronas, trouxeram material para Marília, entregaram meus trabalhos e documentos em Botucatu, me ajudaram na qualificação, foram ótimas companhias em Congressos, nos almoços no IB e nos programas noturnos de "comilança"!

Aos amigos-irmãos de sempre Anderson, Daniela, Mariana, Roberta, Harada, Montanha, Gabriel, Cibele, Cristina e Vanessa, que estiveram ao meu lado nos melhores momentos da minha vida, e também naqueles não tão bons, provando que o tempo e a distância não existem para verdadeiros amigos.

Resumo

A investigação das ações genômicas da testosterona que ocorrem a longo prazo é imprescindível para melhorar a compreensão de algumas situações clínicas como o hipogonadismo e a andropausa. O sistema cardiovascular tem sido considerado um importante alvo de ações desse hormônio, contudo, existem muitas controvérsias acerca das ações androgênicas nos diversos tecidos que compõem esse sistema. Com efeito, existe uma importante lacuna de conhecimento em relação à ação da testosterona em leitos venosos, um compartimento de capacitância que garante um adequado aporte sanguíneo ao coração. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar a influência da orquidectomia e da reposição com este hormônio sobre as respostas vasomotoras de veias isoladas de rato a agonistas simpatomiméticos. Para isto, utilizaram-se ratos Wistar machos adultos controles e orquidectomizados, seguidos ou não de reposição hormonal (propionato de testosterona, 10mg/kg, i.p., por 3 semanas, com intervalo de 5 dias entre as doses). A efetividade da orquidectomia e da reposição hormonal com testosterona foi avaliada por pesagem de órgãos sexuais acessórios hormônio-dependentes e dosagem plasmática de testosterona. Destes animais, anéis (4–5 mm) de veias porta e cava foram estudados em cubas de órgão isolado contendo solução nutritiva de Krebs-Henseleit. As contrações isométricas apresentadas por essas preparações, captadas pelos transdutores isométricos, foram registradas em sistema digital de aquisição de dados. A partir destes registros, obtiveram-se curvas concentração vs resposta e calculou-se pD_2 e resposta máxima (R_{max}). Os resultados mostraram que a orquidectomia seguida ou não de reposição hormonal não alterou a capacidade contrátil de veias porta e cava isoladas de rato frente ao cloreto de potássio, nem tampouco frente à noradrenalina. Contudo, a orquidectomia aumentou a resposta máxima de veia porta isolada de rato, mas não de veia cava, frente à fenilefrina. A reposição hormonal de testosterona foi capaz de reverter este aumento de R_{max} induzido pela orquidectomia. Este aumento de resposta à fenilefrina não foi suprimido na presença de L-NAME ($10^{-4}M$) ou indometacina ($10^{-5}M$), nem tampouco pelo remoção do endotélio. Contudo, foi completamente suprimido na presença do BQ-123 ($10^{-6}M$) e do BQ-788 ($10^{-6}M$). Concluindo, a redução drástica dos níveis circulantes de testosterona induzida pela orquidectomia promoveu um aumento de resposta de veia porta de rato à fenilefrina. Este aumento de resposta, provavelmente, envolveu produção sub-endotelial de endotelina que, por sua vez, atuou tanto em receptores ET_A quanto ET_B .

Palavras-chave: orquidectomia; testosterona; veia porta; veia cava; simpatomiméticos

Abstract

Investigation of genomic testosterone actions is essential to improving the comprehension of some clinical situations such as hypogonadism and andropause. The cardiovascular system has been considered an important target of androgen actions. However, androgenic actions upon this system remain controversial especially in venous territory, an important compartment of capacitance that assures an adequate venous return towards the heart. Thus, the present study aimed to investigate the influence of orchidectomy followed or not by testosterone replacement upon the vasomotor responses to sympathomimetic agonists in isolated veins of rats. In this manner, we used control and orchidectomized adult male Wistar rats, with the latter group followed or not by testosterone replacement (testosterone propionate, 10mg/kg, i.p., for 3 weeks, with 5-day intervals between the doses). The effectiveness of the orchidectomy and the testosterone replacement was evaluated through the weight of sexual accessory hormone-dependent organs and by serum testosterone measurement. Rings (3-4 mm) of portal vein and vena cava were carefully removed from these animals to be set in 10ml organ baths containing Krebs-Henseleit solution. Isometric contractions presented by these preparations were recorded using a digital data acquisition system. These recordings yielded concentration-response curves, pD_2 and maximal response. The results show that orchidectomy, followed or not by testosterone replacement, did not change the contractile capacity of isolated portal and cava veins of rats in response to either potassium chloride or noradrenaline. However, orchidectomy increased the phenylephrine R_{max} in isolated portal vein but not in vena cava. The testosterone replacement was able to reverse this orchidectomy-induced augmentation of R_{max} . Moreover, the increased phenylephrine R_{max} in portal vein was not abolished in the presence of L-NAME ($10^{-4}M$) or indomethacin ($10^{-5}M$), nor by endothelium removal. However, it was completely abolished in the presence of BQ-123 ($10^{-6}M$) and BQ-788 ($10^{-6}M$). In conclusion, the drastic reduction of plasma testosterone levels induced by orchidectomy increased the portal vein responses to phenylephrine. Probably, this augmented response involved the sub-endothelial production of endothelin, which acts through the activation of ET_A and ET_B receptors.

Keywords: orchidectomy; testosterone; portal vein; vena cava; sympathomimetics

Sumário

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	16
2.1 Geral	16
2.2 Específicos	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Animais	17
3.2 Grupos experimentais	17
3.3 Protocolo de orquidectomia	17
3.4 Protocolo de reposição hormonal com testosterona	18
3.5 Pesagens	19
3.6 Dosagem de testosterona plasmática	20
3.7 Isolamento e montagem das preparações de leitos venosos para estudo funcional de reatividade vascular	20
3.8 Remoção química do endotélio vascular	21
3.9 Curvas concentração vs resposta	22
3.10 Investigação funcional da participação de produtos derivados da NOS e COX, bem como da participação da endotelina, na modulação do tônus venoso	22
3.11 Análise de parâmetros farmacológicos	22
3.12 Análise estatística	23
3.13 Diagrama experimental	24
3.14 Drogas e reagentes	25
4. RESULTADOS	26
4.1 Pesagens	26
4.2 Dosagem de testosterona plasmática	28
4.3 Reatividade vascular	28
4.3.1 Veia cava	28
4.3.1.1 Cloreto de potássio	28
4.3.1.2 Noradrenalina	29
4.3.1.3 Fenilefrina	30
4.3.2 Veia porta	31
4.3.2.1 Cloreto de potássio	31
4.3.2.2 Noradrenalina	31
4.3.2.3 Fenilefrina	32

5 DISCUSSÃO	36
5.1 Repercussões não-vasculares da orquidectomia, seguida ou não pela reposição hormonal com testosterona	36
5.2 Repercussões vasculares da orquidectomia, seguida ou não pela reposição hormonal com testosterona	38
5.3 Significado fisiológico das repercussões vasculares da orquidectomia, seguida ou não pela reposição hormonal com testosterona	42
6 CONCLUSÕES	45
7 REFERÊNCIAS	46
8 APÊNDICES	58

Introdução

O sistema cardiovascular tem sido considerado um importante alvo de ações androgênicas. Estudos realizados em seres humanos demonstram a associação entre testosterona – o principal androgênio natural existente – e o aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. A privação androgênica ao longo de seis meses tem sido associada a uma melhora da vasodilatação endotélio-dependente em homens adultos (HERMAN et al., 1997). Isto sugere que a presença de testosterona leva a um efeito deletério da função vascular. Neste sentido, verificou-se uma redução da vasodilatação endotélio-dependente em homens adultos com hipogonadismo após o tratamento com testosterona (SADER et al., 2003; BERNINI et al., 2006). Alguns estudos também mostraram que os hormônios sexuais podem modular os níveis plasmáticos de endotelina, um potente peptídeo vasoconstritor (POLDERMAN et al., 1993). Ainda de acordo com esses autores, os níveis plasmáticos de endotelina são maiores em indivíduos do sexo masculino. Este conhecimento tem grande importância prática uma vez que já foi demonstrado o envolvimento da endotelina no desenvolvimento de hipertensão (KOHNO et al., 1990; CARDILLO et al., 1999; RAICHLIN et al., 2008) e de aterosclerose (LERMAN et al., 1991; IHLING et al., 2001; SAINANI, MARU, MEHRA, 2005).

Em contrapartida, outros estudos têm demonstrado um efeito protetor da testosterona sobre a patogênese de doenças cardiovasculares. Baixos níveis plasmáticos de testosterona, contrariamente ao que foi relatado anteriormente, podem estar associados com disfunção endotelial, o que sugere um efeito protetor da testosterona endógena sobre a função endotelial (AKISHITA et al., 2007). A administração intracoronária de testosterona, em concentrações fisiológicas, induz dilatação arterial coronariana e aumenta o fluxo sanguíneo coronariano em homens com doença arterial coronariana (WEBB et al., 1999). Fica evidente, portanto, que existem muitas controvérsias acerca das ações androgênicas no sistema cardiovascular.

A testosterona pode agir diretamente sobre o sistema cardiovascular, através de mecanismos não-genômicos que não dependem dos classicamente descritos receptores intracelulares de androgênio (JONES et al., 2003). Esta ação vascular da testosterona parece ser mediada por receptores de androgênio localizados na membrana plasmática de células da musculatura lisa vascular e endotélio (HONDA, UNEMOTO, KOGO, 1999; JONES et al., 2003; SIMONCINI, GENAZZANI, 2003;

ORSHAL, KHALIL, 2004) que, ao serem ativados, modulam a função de canais iônicos presentes nesta membrana (YUE et al., 1995; COSTARELLA et al., 1996; TEOH, QUAN, MAN, 2000a; TEP-AREENAN, KENDALL, RANDALL, 2002).

Os efeitos não-genômicos da testosterona sobre o sistema cardiovascular caracterizam-se por serem desencadeados agudamente (SIMONCINI, GENAZZANI, 2003). Tais efeitos são demonstrados geralmente em preparações isoladas de leitos vasculares incubados ou perfundidos previamente com testosterona. Neste sentido, observou-se efeito vasorrelaxante direto da testosterona em artéria coronária de porcos (DEENADAYALU et al., 2001) e coelhos (YUE et al., 1995), em aorta de ratos (COSTARELLA et al., 1996; HONDA, UNEMOTO, KOGO, 1999; DING, STALLONE, 2001) e coelhos (YUE et al., 1995), bem como em leito arterial mesentérico de rato (TEP-AREENAN, KENDALL, RANDALL, 2002). Um possível envolvimento de canais iônicos, mais especificamente de canais de potássio, neste efeito vasorrelaxante direto da testosterona tem sido proposto por esses autores. Contudo, o envolvimento de mecanismos endotélio-dependentes, relacionados à liberação de óxido nítrico (NO), também tem sido proposto na vasodilatação direta induzida pela testosterona (COSTARELLA et al., 1996; TEP-AREENAN, KENDALL, RANDALL, 2002). Além disso, o envolvimento de canais de potássio sensíveis ao ATP, paralelamente ao NO, tem sido proposto no relaxamento das artérias coronárias de cães após a infusão de testosterona (CHOU et al., 1996). A presença endotelial, por outro lado, não parece ser imprescindível neste fenômeno uma vez que tiras deendotelizadas de artéria coronária de porcos machos orquidectomizados também apresentaram relaxamento induzido pela testosterona (CREWS, KHALIL, 1999). Por fim, efeitos vasorrelaxantes também foram observados com a utilização do metabólito da testosterona, 5 β -diidrotestosterona, em aorta isolada de rato (PERUSQUIA, VILLALON, 1999).

A testosterona, além das ações vasomotoras diretas, pode exercer modulação sobre a ação de outros agentes vasomotores através de mecanismos não-genômicos (JONES, JONES, CHANNER, 2004). A incubação de aortas isoladas de coelhos machos com testosterona foi responsável por agravar a disfunção endotelial induzida por dieta rica em colesterol e pela exposição à fumaça de cigarro, comprometendo ainda mais a resposta vasodilatadora destas preparações à acetilcolina (HUTCHISON et al., 1997). Foi descrito também que artérias coronárias

isoladas de porcos, incubadas com testosterona, apresentam uma atenuada vasodilatação induzida por bradicinina e ionóforo de cálcio (TEOH, QUAN, MAN, 2000a). Da mesma forma, a testosterona bloqueou o efeito vasodilatador induzido por adenosina em coração isolado de ratos, redundando em aumento da resistência vascular coronariana (CEBALLOS et al., 1999).

Além disso, a incubação com testosterona tem sido associada à inibição do aumento de cálcio intracelular provocado pela prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) em cultura de células musculares de aorta A7r5 (JONES et al., 2003). A incubação com testosterona também atenuou a contração induzida por $PGF2\alpha$ em artéria mesentérica de porcos Yorkshire orquidectomizados (MURPHY, KHALIL, 1999). Por outro lado, foi relatado um aumento da resposta vasoconstritora à endotelina, serotonina e ao U46619, um análogo da $PGF2\alpha$, em artérias coronárias isoladas de porcos, após incubação com testosterona (TEOH et al., 2000b). A incubação com testosterona também foi responsável por aumentar a secreção de endotelina por células endoteliais de aorta de seres humanos (PEARSON et al., 2008).

A testosterona, além das ações não-genômicas mencionadas, pode modular a reatividade vascular através dos mecanismos classicamente descritos como genômicos. Sintetizando, entende-se por mecanismos genômicos a regulação da transcrição do DNA através de receptores de androgênio (AR) intracelulares localizados no citoplasma, que se translocam para o núcleo tanto de células endoteliais quanto da musculatura lisa vascular (McGILL, SHERIDAN, 1981; HORWITZ, HORWITZ, 1982; LIN, GONZALES, SHAIN, 1985; TRAISH, MÜLLER, WOTIZ, 1986; STUMPF, 1990; FUJIMOTO et al., 1994; HIGASHIURA, MATHUR, HALUSHKA, 1997; WU, ECKARDSTEIN, 2003; ORSHAL, KHALIL, 2004).

Neste sentido, genes específicos podem ser induzidos ou reprimidos, influenciando os padrões de síntese protéica e, conseqüentemente, os efeitos fisiológicos relacionados ao controle de tônus vascular (ORSHAL, KHALIL, 2004). A testosterona pode então influenciar a síntese, liberação e atividade de fatores locais, relacionados à musculatura lisa e/ou endotélio, que controlam o tônus vascular (FARHAT et al., 1995). Uma das características dos efeitos genômicos da testosterona é que estes acontecem a longo prazo. Assim, os modelos experimentais utilizados para o estudo de tais efeitos normalmente envolvem

orquidectomia e/ou tratamento hormonal dos animais com testosterona.

A investigação das ações genômicas da testosterona é imprescindível para melhorar a compreensão de algumas situações clínicas decorrentes de variações a longo prazo dos níveis séricos deste hormônio. O hipogonadismo congênito, por exemplo, é uma situação clínica na qual a produção de testosterona e conseqüentemente a sua função fisiológica estão prejudicadas (ZITZMANN, BRUNE, NIESCHLAG, 2002; SADER et al., 2003; BERNINI et al., 2006). Um declínio progressivo dos níveis de testosterona também é observado com o envelhecimento do homem, em decorrência de uma redução natural da função do eixo hipotalâmico-hipofisário, caracterizando assim a situação clínica conhecida como andropausa (VERMEULEN, RUBENS, VERDONCK, 1972; BAUM, CRESPI, 2007; SEIDMAN, 2007). Neste sentido, a terapia de reposição hormonal com testosterona é a alternativa farmacológica muitas vezes utilizada para o tratamento dos indivíduos que se encontram em tais situações (BHASIN et al., 2006)

O tratamento crônico com testosterona, ao contrário daquilo que é freqüentemente observado na exposição aguda a este hormônio, na maioria das vezes exerce uma modulação positiva sobre a resposta vascular induzida por diversos agonistas. Neste sentido, a testosterona administrada cronicamente potencializou a vasodilatação de artérias coronárias induzida por acetilcolina em macacas e paralelamente agravou a aterosclerose induzida por dieta rica em gordura (ADAMS, WILLAMS, KAPLAN, 1995). O tratamento com testosterona por três semanas também potencializou a vasodilatação induzida por acetilcolina em trem posterior de ratas espontaneamente hipertensas ovariectomizadas (TATCHUM-TALOM, MARTEL, MARETTE, 2002). Contudo, a literatura não apresenta estudos que investigam o efeito do tratamento crônico com testosterona sobre as respostas vasodilatadoras em machos.

As ações de agonistas vasoconstritores também parecem ser influenciadas pelo tratamento com este hormônio. Em estudos in vivo, o tratamento com testosterona potencializou a resposta pressórica induzida pela noradrenalina em gatos (BHARGAVA, DHAWAN, SAXENA, 1967) e ratos (BAKER, RAMEY, RAMWELL, 1978), assim como no trem-posterior perfundido de cachorros (GREENBERG et al., 1974). Observou-se também um aumento do tônus vascular de pequenas artérias cerebrais de resistência em ratos orquidectomizados, quando

suplementados por um mês com testosterona. Este aumento de tônus parece dever-se à supressão de mecanismos hiperpolarizantes presentes nestas artérias cerebrais induzida pela testosterona (GONZALES, KRAUSE, DUCKLES, 2004), ou por um aumento na expressão da tromboxano A2 sintase (TXA2 sintase) e conseqüente produção local de tromboxano A2 (TXA2) (GONZALES et al., 2005). Além disso, a suplementação por um mês com testosterona restabelece o tônus vascular de pequenas artérias cerebrais de resistência de ratos, diminuído pela orquidectomia. Sugere-se, neste estudo, que o reestabelecimento do tônus vascular promovido pela testosterona deve-se à modulação de fatores derivados do endotélio relacionados à cicloxigenase (COX) e independentes da NO-sintase (NOS) (GEARY, KRAUSE, DUCKLES, 2000). A constrição induzida por U46619 em artérias coronárias de cobaias machos também foi potencializada com o tratamento hormonal, indicando que a testosterona pode aumentar a reatividade vascular de artéria coronária frente ao TXA2 (SCHROR et al., 1994). A testosterona também foi responsável por potencializar a constrição de artérias coronárias de porcos domésticos de ambos os sexos, induzida por cloreto de potássio. Contudo nos machos, mas não em fêmeas, a remoção endotelial suprimiu este efeito potencializador da testosterona sobre a reatividade ao cloreto de potássio. Isto pode indicar que as alterações de resposta vasomotora deste leito vascular, desencadeadas pelo tratamento dos animais machos com testosterona, seja decorrente de uma menor produção de fatores relaxantes ou de uma maior produção de fatores contraturantes por parte do endotélio vascular (FARHAT et al., 1995).

Em artérias mesentéricas de resistência de ratos, o tratamento com indometacina reduziu as respostas contráteis induzidas por fenilefrina em machos, mas não em fêmeas. Além disso, foi observado que a orquidectomia reduziu a produção dos metabólitos da COX nesses animais, sugerindo o envolvimento da testosterona no controle da produção de prostanóides (McKEE et al., 2003). Vale lembrar ainda que a testosterona pode estar envolvida não só no controle da produção de metabólitos da COX, mas também na síntese e atividade de outros fatores vasoconstritores, tais como a endotelina (van KESTEREN et al., 1998).

Como pode ser observado nesta breve revisão de literatura, o conhecimento das ações da testosterona sobre a reatividade vascular ainda é bastante escasso.

Além disso, os trabalhos citados anteriormente foram todos realizados em leitos arteriais, sendo ainda mais escassas as informações sobre os efeitos da testosterona em leitos venosos. Esta carência de informações merece especial atenção em vista do papel central que os leitos venosos exercem no equilíbrio hemodinâmico, uma vez que comportam cerca de 60-80% do sangue dos mamíferos durante o repouso (ROTHER, 1983; ROTHER, 2006). Dessa forma, o deslocamento de grandes volumes sanguíneos a partir deste território de capacitância garante a manutenção de um adequado aporte sanguíneo ao coração, além de influenciar a resistência vascular periférica (ABDEL-SAYED, ABOUD, BALLARD, 1970).

Cabe ressaltar que, a exemplo dos leitos arteriais, o tônus venoso também é regulado pela ação de fibras autonômicas simpáticas aí evidenciadas (DONEGAN, 1921; FURNESS, MARSHALL, 1974; ROTHER, 1983; SUTTER, 1990; ROWELL, 1993). A participação simpática é determinante, sobretudo nas modificações rápidas do retorno venoso como, por exemplo, nas modificações posturais e durante o exercício (ROWELL, 1993). Com efeito, a noradrenalina liberada pelas terminações nervosas simpáticas atua sobre adrenoreceptores α e β , apresentando como efeito final a venoconstrição (KAISER, ROSS, BRAUNWALD, 1964; MÜLLER-RUCHHOLTZ et al., 1977a,b). Dessa forma, essa ação venocontrátil da noradrenalina controla o tônus venoso e, indiretamente, o retorno venoso. Por fim, a ação da noradrenalina em leitos venosos também é modulada por substâncias produzidas localmente, nas camadas endoteliais ou sub-endoteliais (RUBANYI, VANHOUTTE, 1988; MCGRATH et al., 1990; WOODLEY, BARCLAY, 1994; DÖRNYEI et al., 1996; SHIBAMOTO et al., 2005). É razoável supor, então, que a testosterona influencie as respostas dos leitos venosos aos agonistas simpatomiméticos da mesma forma como faz em leitos arteriais.

Objetivos

2.1 Geral

Estudar a influência da orquidectomia e da reposição hormonal com testosterona ao longo de três semanas sobre as respostas vasomotoras de veias isoladas de rato a agonistas simpatomiméticos.

2.2 Específicos

- Verificar se as respostas vasomotoras das preparações de veias porta e cava, não mediadas por adrenoceptores, podem ser modificadas pela orquidectomia, seguida ou não pela reposição hormonal com testosterona;
- Verificar se a orquidectomia modifica as respostas vasomotoras de veias porta e cava à noradrenalina e à fenilefrina;
- Verificar se as modificações das respostas vasomotoras de veias porta e cava aos agonistas simpatomiméticos estudados, decorrentes da orquidectomia, podem ser revertidas pela reposição hormonal com testosterona;
- Investigar a participação de mecanismos endoteliais e/ou sub-endoteliais, relacionados ao NO, aos prostanóides e à endotelina, nas modificações das respostas vasomotoras destes leitos venosos aos agonistas simpatomiméticos estudados, induzidas pela orquidectomia e/ou reposição hormonal com testosterona.

Material e Métodos

A realização do presente trabalho foi aprovada em Reunião Ordinária pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Marília – FAMEMA, em 20/05/2007, cuja documentação está registrada sob o nº 232/07.

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA). Durante a semana que antecedeu os experimentos, os animais permaneceram no biotério de apoio ligado aos laboratórios das disciplinas básicas da Instituição. Com efeito, esses animais foram mantidos em gaiolas coletivas contendo três animais, em ambiente com temperatura controlada (23-25°C), ciclo claro-escuro de doze horas, água e ração *ad libitum*. No sentido de se garantir a homogeneidade dos grupos estudados, estes foram constituídos por animais de mesma idade e com pesos semelhantes conforme descrito a seguir.

3.2 Grupos experimentais

Os 109 animais utilizados foram divididos em três grupos: controles (falso-operados) (41 animais), orquidectomizados (44 animais) e orquidectomizados com subsequente reposição hormonal de testosterona (24 animais).

3.3 Protocolo de orquidectomia

A partir dos 75 dias de idade considera-se que os ratos já estão na fase adulta. Com efeito, os animais foram orquidectomizados ao completar 90 dias de idade, pois os níveis plasmáticos de testosterona estabilizam-se por volta desta idade (WHITE, RIVERA, DAVISON, 2000). Para tanto, foram anestesiados com tribromoetanol (250mg/kg, por via intraperitoneal) e colocados em decúbito dorsal sobre campo cirúrgico. Foi feita a tricotomia e posteriormente uma incisão longitudinal na região mediana do escroto, exteriorizando-se um dos testículos. O fluxo sangüíneo oriundo do pedículo vascular foi interrompido e o testículo foi então extirpado. O mesmo processo foi repetido para a remoção do testículo contra-lateral.

Extirpadas as gônadas, as estruturas remanescentes foram recolocadas na bolsa escrotal e a ferida operatória foi suturada (VALLE et al., 1982). Ao final da cirurgia, os animais receberam injeção profilática de penicilina (GONZALES, KRAUSE, DUCKLES, 2004). Os animais controles foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém a extirpação das gônadas não foi realizada. Dessa forma garantiu-se que estes animais controles fossem submetidos às mesmas condições experimentais dos animais orquidectomizados. A efetividade da orquidectomia foi avaliada pela pesagem dos órgãos sexuais acessórios hormônio-dependentes (VALLE et al., 1982) e pela dosagem plasmática de testosterona conforme técnicas descritas a seguir. Considerou-se efetiva a orquidectomia quando foi constatada a redução de peso dos órgãos sexuais acessórios hormônio-dependentes, bem como uma diminuição drástica das concentrações séricas de testosterona. Realizou-se em paralelo a pesagem das glândulas adrenais, uma vez que também são órgãos produtores de andrógenos.

No período de três a cinco dias após a realização das cirurgias, os animais foram devidamente identificados e mantidos em gaiolas individuais. Este cuidado visou evitar o contato entre os animais operados, garantindo assim uma melhor recuperação pós-cirúrgica (GONZALES, KRAUSE, DUCKLES, 2004). Após a concretização da cicatrização os animais foram reagrupados em gaiolas coletivas contendo três animais.

3.4 Protocolo de reposição hormonal com testosterona

Na literatura observa-se a existência de uma grande variedade de esquemas de reposição hormonal de testosterona. Nota-se que cada um dos esquemas propostos apresenta particularidades no que se refere à duração do tratamento, dose, intervalo entre as doses e via de administração. Observa-se ainda que a utilização desses esquemas varia de acordo com a espécie estudada, bem como, com os propósitos de cada investigação. Com efeito, tendo em vista os objetivos do presente estudo, bem como as condições experimentais disponíveis, estabeleceu-se um esquema de reposição hormonal baseado em estudos preliminares desenvolvidos em porcos (FARHAT et al., 1995) e ratos (VALLE, 1976; MADDOX et

al., 1987; MATSUDA et al., 1994). Assim, o tratamento de reposição hormonal iniciou-se no 23º dia após a orquidectomia uma vez que a literatura sugere a estabilização da atrofia dos órgãos sexuais acessórios hormônio-dependentes por volta do 20º dia (VALLE et al., 1982). O hormônio utilizado para o tratamento dos animais foi o propionato de testosterona, 10mg/kg por via intramuscular, com intervalo de cinco dias entre as doses, durante três semanas. Os animais controles (falso-operados) receberam tratamento paralelo com igual volume de veículo (óleo de milho). Após dois dias da realização da última administração de propionato de testosterona ou veículo, os animais foram sacrificados para a realização dos experimentos de reatividade vascular.

A efetividade da reposição hormonal utilizada foi constatada tanto pela reversão da redução do peso úmido dos órgãos sexuais acessórios hormônio-dependentes induzida pela orquidectomia quanto pelo restabelecimento dos níveis séricos de testosterona. O impacto da reposição hormonal com testosterona em animais orquidectomizados também foi avaliado pela aferição do peso úmido das glândulas adrenais.

Em etapa preliminar de padronização da metodologia, foi a reversão da redução do peso úmido dos órgãos sexuais acessórios hormônio-dependentes, induzida pela orquidectomia, que serviu de base para a definição do esquema de reposição hormonal a ser utilizado no presente estudo.

3.5 Pesagens

No momento da distribuição aleatória dos animais nos grupos experimentais, estes foram pesados em balança (modelo 9094c/5, Toledo, Brasil) para que a homogeneidade de peso desses grupos fosse garantida. Uma segunda pesagem foi realizada no dia do estudo funcional de reatividade vascular, imediatamente antes do sacrifício destes animais. No momento do sacrifício dos animais para a realização dos estudos de reatividade vascular, realizou-se a dissecação e remoção de órgãos sexuais acessórios hormônio-dependentes (vesículas seminais, ductos deferentes, epidídimos e próstata), bem como das glândulas adrenais. Em seguida, esses órgãos foram pesados em balança analítica (modelo AB204, Toledo, Brasil) conforme protocolo descrito por Valle et al. (1982), a fim de se constatar a

efetividade da orquidectomia, bem como da reposição hormonal com testosterona. Os resultados de pesagem de órgãos foram apresentados na forma de uma relação entre o peso do órgão (em gramas) e o peso corporal total do animal (em quilogramas).

3.6 Dosagem de testosterona plasmática

Amostras de sangue foram coletadas com seringas contendo heparina através de punção cardíaca realizada com os animais anestesiados, imediatamente antes do sacrifício dos mesmos. Posteriormente, tais amostras foram centrifugadas a 2500rpm por 20min a 2°C. O sobrenadante foi recuperado e estocado a -20°C para posterior determinação dos níveis hormonais de testosterona por quimioluminescência (YILMAZ et al., 2006). A determinação dos níveis hormonais de testosterona foi realizada pelo *Laboratório Álvaro Análises e Pesquisas Clínicas – Cascavel/PR*.

3.7 Isolamento e montagem das preparações de leitos venosos para estudo funcional de reatividade vascular

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/kg, por via intraperitoneal) e exangüinados. Em seguida, os leitos das veias porta e cava infra-renal foram dissecados. Depois, um anel (4-5mm) de cada um desses leitos foi obtido e transferido para uma placa de Petri onde, com auxílio de uma lupa, foram fixados entre 2 ganchos de metal (inseridos no lúmen). Em seguida, estes anéis foram montados em cubas para estudo de órgão isolado de 10ml contendo solução nutritiva de Krebs-Henseleit com a seguinte composição (mM): NaCl 130,0; KCl 4,7; CaCl₂ 1,6; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 15,0 e glicose 11, 1. A solução nutritiva, com pH 7,4, permaneceu aquecida a 37°C e constantemente gaseada com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂). Um dos ganchos de metal foi conectado a um suporte fixo ajustável e o outro, a um transdutor isométrico de força (modelo ML221, ADInstruments, Austrália) . As modificações de tônus dessas preparações foram registradas através de sistema de aquisição de dados Powerlab® 8/30

(ADInstruments, Austrália).

Durante os 60 minutos que precederam o início do protocolo experimental, as preparações foram mantidas em repouso sob tensão de 0,5g, visando a estabilização das mesmas. Neste período, bem como durante todo o experimento, a solução nutritiva foi substituída a cada 15 minutos. Em seguida, para testar a viabilidade das preparações, estas foram contraídas com fenilefrina 10^{-4} M.

3.8 Remoção química do endotélio vascular

Algumas preparações, antes da realização dos estudos de reatividade vascular, tiveram seus endotélios removidos quimicamente através da perfusão seqüencial de Krebs-Henseleit (1ml), deoxicolato de sódio 0,75% (2,5ml) e Krebs-Henseleit (1ml). A efetividade da remoção endotelial foi verificada funcionalmente, ou seja, ao final dos experimentos procedeu-se o desafio dessas preparações com clonidina 10^{-6} M na presença de L-NAME 10^{-4} M, um inibidor não-seletivo da NOS. A ausência de resposta contrátil frente à clonidina nestas condições indicou remoção endotelial efetiva (SHIMAMURA et al., 2006). A remoção endotelial também foi confirmada por análise histológica. Para tanto, após a conclusão dos experimentos de reatividade vascular, as preparações foram fixadas em formalina 10% por 48 horas, emblocadas em parafina e cortadas a 4-5 μ m. A seguir, foram coradas por hematoxilina-eosina para, enfim, serem analisadas através de microscopia óptica (aumento de 100 vezes).

A análise de lâminas que apresentavam cortes de preparações intactas ou deendotelizadas foi feita em duplo-cego. Estipulou-se, antes do início da análise, uma escala subjetiva determinada em cruzes, que foi utilizada como parâmetro da análise visual realizada. Assim, a ausência de cruzes indicou ausência de remoção endotelial, uma cruz (+) indicou 25% de remoção endotelial, duas cruzes (++) indicaram 50% de remoção endotelial, três cruzes (+++) indicaram 75% de remoção endotelial e quatro cruzes (+++++) indicaram remoção endotelial completa. Foram consideradas sem endotélio as preparações (+++) ou (+++++), verificadas em no mínimo cinco cortes transversais.

3.9 Curvas concentração vs resposta

A reatividade vascular foi estudada através da obtenção de curvas concentração vs resposta cumulativas para noradrenalina (10^{-10} - 10^{-4} M), fenilefrina (10^{-10} - 10^{-4} M) e cloreto de potássio (10^{-2} M – $1,2 \cdot 10^{-1}$ M). O aumento da concentração de K^+ na solução de Krebs-Henseleit (solução despolarizante) foi feito paralelamente a uma redução compensatória da concentração de Na^+ .

3.10 Investigação funcional da participação de produtos derivados da NOS e COX, bem como da participação da endotelina, na modulação do tônus venoso

Os estudos de reatividade vascular dos anéis veia porta e cava, obtidos dos animais pertencentes aos grupos estudados, foram realizados também na presença de L-NAME 10^{-4} M e/ou indometacina 10^{-5} M, sendo o último um inibidor não-seletivo da COX. Algumas preparações foram estudadas ainda na presença do BQ-123 10^{-6} M e do BQ-788 10^{-6} M, antagonistas seletivos de receptores de endotelina tipo A (ET_A) e tipo B (ET_B), respectivamente. Estes inibidores foram administrados diretamente ao banho 20 minutos antes do início das curvas concentração vs resposta.

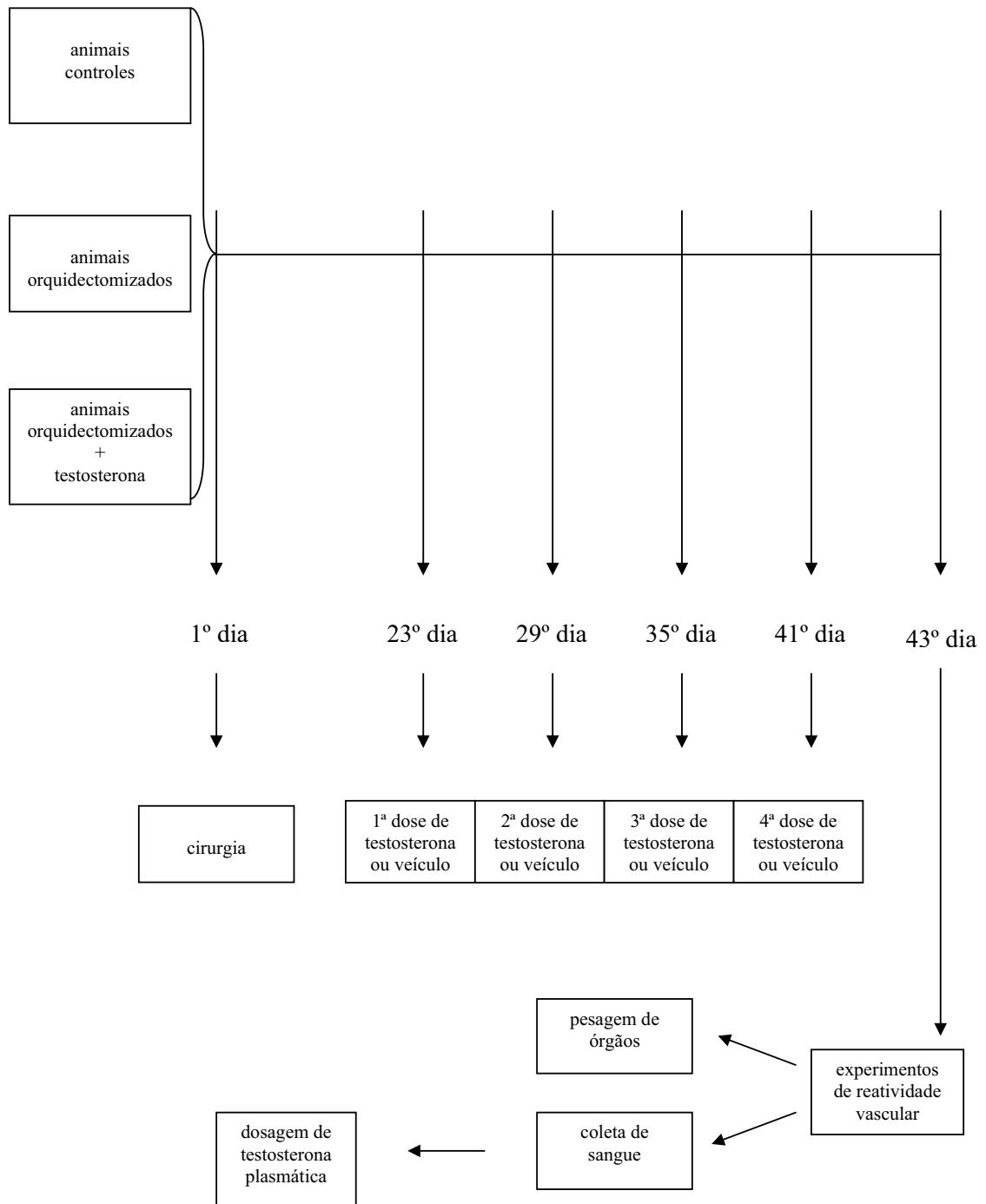
3.11 Análise de parâmetros farmacológicos

A partir das curvas concentração vs resposta obtidas foram calculados os valores de pD_2 , que consiste no negativo do logaritmo da concentração molar do agonista responsável por 50% do efeito máximo (EC_{50}). Os valores de EC_{50} foram calculados por regressão não linear através do programa Prism 4.0® (GraphPad Software, E.U.A.). Determinou-se também os valores de resposta contrátil máxima (R_{max}) das preparações de veia porta e cava aos agonistas.

3.12 Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos pela média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). A análise estatística dos resultados obtidos foi feita por teste t de Student para comparações entre dois grupos, por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni, quando as comparações foram feitas entre três grupos e análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Bonferroni, quando as comparações foram feitas entre três grupos ao longo do tempo. Diferenças nos valores de $P < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

3.13 Diagrama experimental



3.14 Drogas e reagentes

- bicarbonato de sódio P.A. (Synth, Brasil)
- BQ-123 (Sigma Co., E.U.A.)
- BQ-788 (Sigma Co., E.U.A.)
- clonidina (clonidine hydrochloride, Sigma Co., E.U.A.)
- cloreto de cálcio dihidratado P.A. (calcium chloride dihydrate, Merck, Alemanha)
- cloreto de potássio P.A. (Synth, Brasil)
- cloreto de sódio P.A. (Synth, Brasil)
- D-glicose anidra (dextrose) P.A. (Synth, Brasil)
- deoxicolato de sódio (sodium deoxycholate, Sigma Co., E.U.A.)
- fenilefrina ((R)-(-)-phenylephrine hydrochloride, Sigma Co., E.U.A.)
- fosfato de potássio monobásico anidro P.A. (Synth, Brasil)
- heparina sódica 5000UI/ml solução injetável (Cristália, Brasil)
- indometacina (indomethacin, Sigma Co., E.U.A.)
- L-NAME (N_{ω} -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride, Sigma Co., E.U.A.)
- noradrenalina ((S)-(+)-norepinephrine L-bitartrate, Sigma Co., E.U.A.)
- óleo de milho (Cargill, Brasil)
- penicilina (benzil penicilina G procaína/benzatina e diidroestreptomicina, Eurofarma, Brasil)
- propionato de testosterona (testosterone propionate, Sigma Co., E.U.A.)
- sulfato de magnésio P.A. (Synth, Brasil)
- tribromoetanol (2,2,2-tribromoethanol, Acros Organics, E.U.A.)

Resultados

4.1 Pesagens

Na primeira pesagem dos animais não foram constatadas diferenças significativas entre o peso dos animais controle e orquidectomizados, seguidos ou não de reposição hormonal com testosterona. Por ocasião da segunda pesagem observou-se uma redução de peso dos animais orquidectomizados frente ao peso dos animais controles e orquidectomizados seguidos de reposição hormonal (Tabela 1).

Tabela 1- Peso corporal total dos animais controles (CONT), orquidectomizados (ORQ) e orquidectomizados seguidos por reposição com testosterona (ORQ+T), em quilogramas (kg), obtidos no dia da orquidectomia e no dia do experimento de reatividade vascular

animais	peso dia orquidectomia (kg)	peso dia experimento (kg)
CONT	0,365±0,011	0,426±0,011 ^{***}
ORQ	0,335±0,010	0,377±0,010 ^{***,#}
ORQ+T	0,360±0,014	0,407±0,013 ^{***}

Valores apresentados em média ± E.P.M. de 14-17 preparações independentes. ***P<0,001 em relação aos respectivos pesos corporais obtidos na 1ª pesagem; #P<0,01 em relação ao peso corporal dos animais CONT obtido na 2ª pesagem; ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

Na Figura 1 são apresentados os pesos dos órgãos sexuais acessórios hormônio-dependentes obtidos dos animais controles e orquidectomizados submetidos ou não à reposição hormonal com testosterona, normalizados pelo peso corporal total dos animais estudados. Estes resultados mostram que a orquidectomia promoveu uma redução significativa de peso das vesículas seminais esvaziadas ou não do líquido seminal, redução esta que foi completamente revertida pela reposição hormonal com testosterona (Figuras 1A e 1B). Com efeito, o volume de líquido seminal foi reduzido pela orquidectomia e restabelecido pela reposição hormonal (Figura 1C). Evento semelhante foi observado com a próstata, ou seja, a orquidectomia promoveu uma redução significativa do peso desse órgão que foi completamente revertida pela reposição hormonal com testosterona (Figura 1D). Um fenômeno ligeiramente distinto ocorreu nos ductos deferentes (Figura 1E) e epidídimos (Figura 1F), onde a orquidectomia promoveu uma redução significativa do peso dessas estruturas, contudo, a reposição hormonal reverteu apenas

parcialmente essa redução de peso.

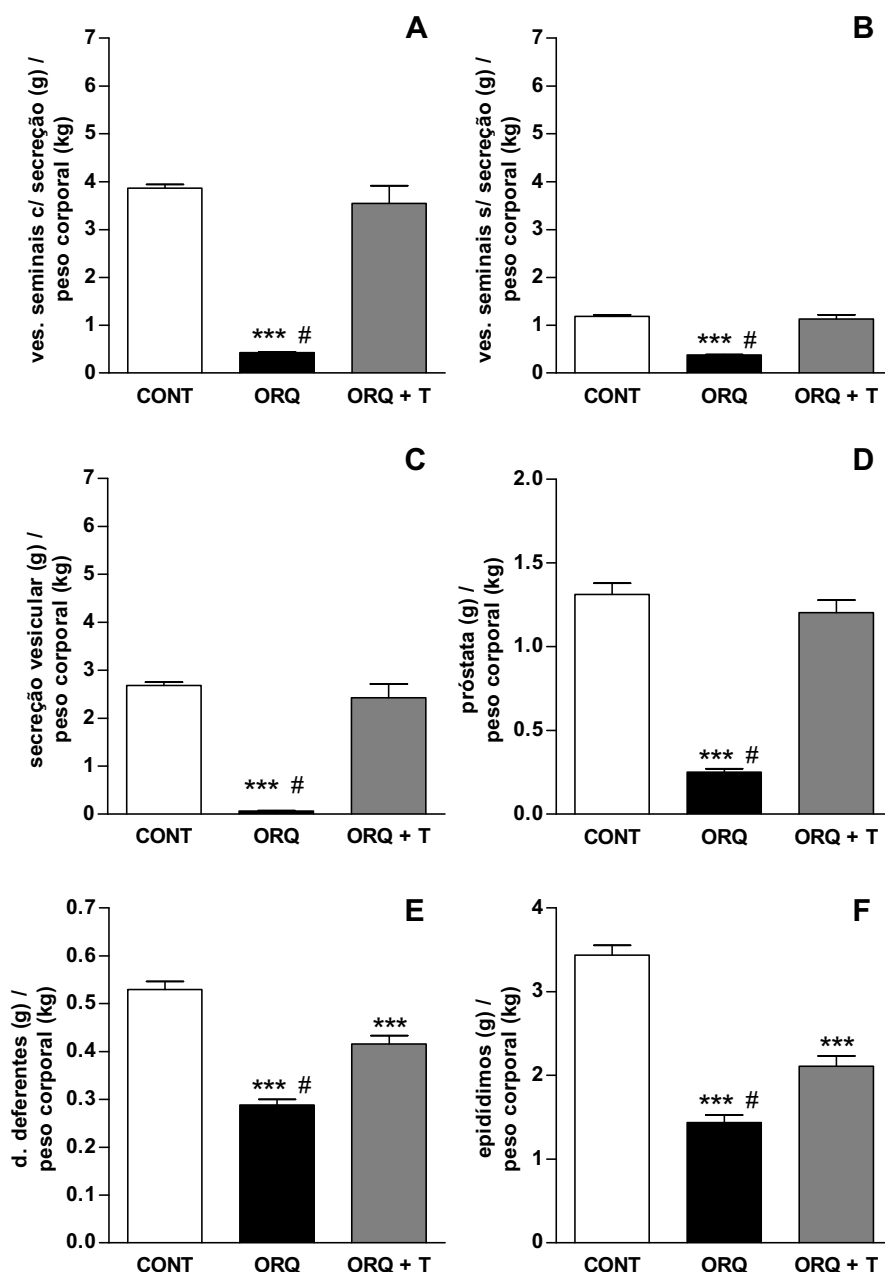


Figura 1- Peso da vesícula seminal com (A) e sem secreção (B), bem como da secreção seminal (C), além da próstata (D), ductos deferentes (E) e epidídimos (F) obtidos de animais controles (CONT), orquidectomizados (ORQ) e orquidectomizados submetidos à reposição com testosterona (ORQ+T). Barras representam a média $\pm$ E.P.M. de 14-17 preparações independentes. *** $P < 0,001$ em relação aos animais CONT; # $P < 0,001$ em relação aos animais ORQ+T. ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni

Na Figura 2 é apresentado o peso das glândulas adrenais normalizado pelo peso corporal total dos animais estudados. A orquidectomia promoveu aumento significativo da massa das glândulas adrenais, aumento este completamente revertido pela reposição hormonal com testosterona.

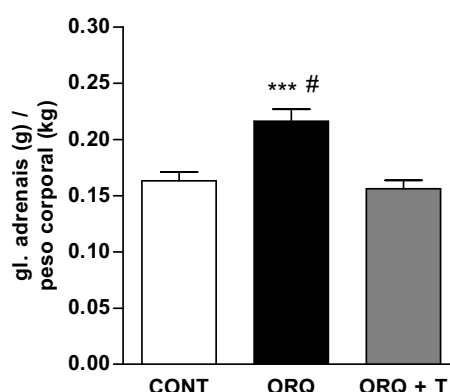


Figura 2- Peso das glândulas adrenais obtidos de animais controles (CONT), orquidectomizados (ORQ) e orquidectomizados submetidos à reposição de testosterona (ORQ+T). Barras representam a média $\pm$ E.P.M. de 14-17 preparações independentes. ***P<0,001 em relação aos animais CONT; #P<0,001 em relação aos animais ORQ+T. ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni

4.2 Dosagem de testosterona plasmática

A orquidectomia reduziu a concentração plasmática de testosterona de $200,4 \pm 52,67$ ng/dl para $9,87 \pm 4,70$ ng/dl. Após a reposição hormonal, contudo, a concentração plasmática de testosterona determinada foi de $1134,0 \pm 109,4$ ng/dl.

4.3 Reatividade vascular

4.3.1 Veia cava

4.3.1.1 Cloreto de potássio

Em preparações isoladas de veia cava, a orquidectomia seguida ou não de reposição hormonal com testosterona não produziu modificações significativas no padrão das curvas concentração vs resposta para o cloreto de potássio quando

comparadas com as curvas obtidas de animais controles (Figura 3A). Com efeito, nenhuma diferença significativa foi observada em relação aos parâmetros de Rmax (Figura 3B) e pD_2 (Figura 3C).

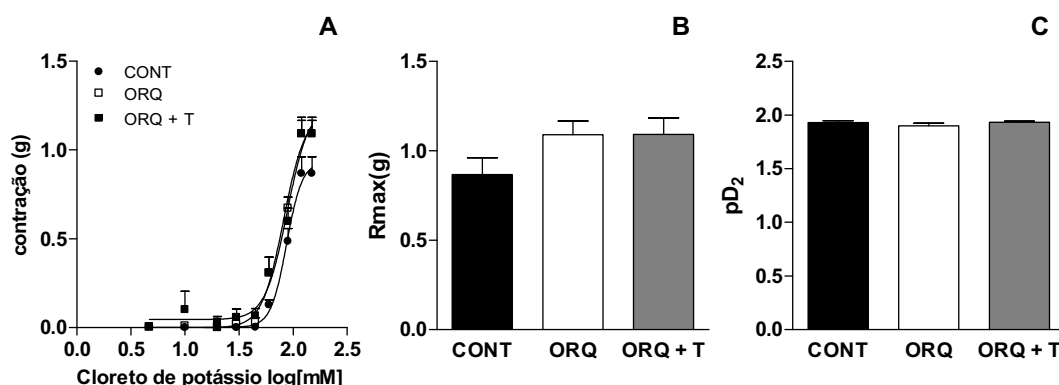


Figura 3- Curvas concentração vs resposta para cloreto de potássio ($10^{-2}M - 1,2 \times 10^{-1}M$) (A), bem como valores de Rmax (B) e pD_2 (C) obtidos em preparações de veia cava isoladas de animais controles (CONT), orquidectomizados (ORQ) e orquidectomizados seguidos de reposição hormonal (ORQ+T). Valores apresentados em média $\pm$ E.P.M. de 6-8 preparações independentes

4.3.1.2 Noradrenalina

A orquidectomia seguida ou não pela reposição hormonal com testosterona não modificou significativamente o padrão das curvas concentração vs resposta para noradrenalina determinadas em preparações isoladas de veia cava (Figura 4A). Dessa forma, não foram observadas diferenças significativas em relação aos parâmetros de Rmax (Figura 4B) e pD_2 (Figura 4C) para noradrenalina obtidos nessas preparações.

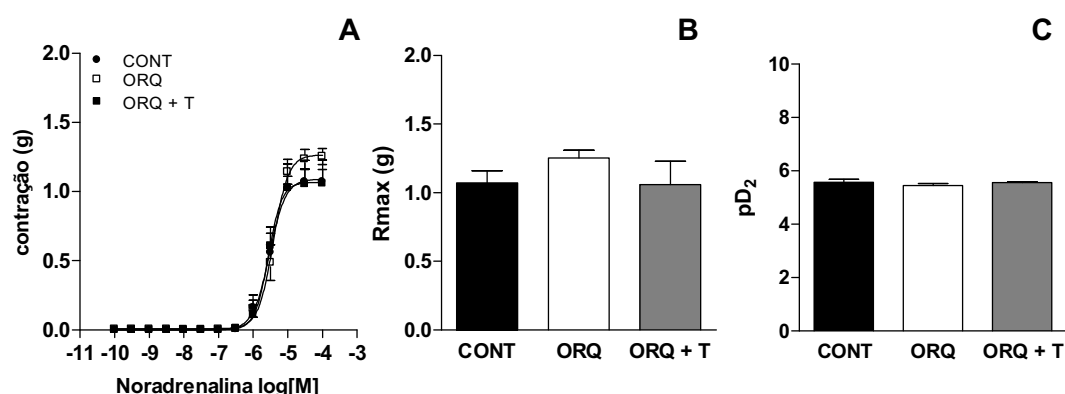


Figura 4- Curvas concentração vs resposta para noradrenalina (A), bem como valores de Rmax (B) e pD_2 (C) obtidos de preparações de veia cava isoladas de animais controles (CONT), orquidectomizados (ORQ) e orquidectomizados seguidos de reposição hormonal (ORQ+T). Valores apresentados em média $\pm$ E.P.M. de 6-8 preparações independentes

4.3.1.3 Fenilefrina

A orquidectomia seguida ou não pela reposição hormonal com testosterona não modificou significativamente o padrão das curvas concentração vs resposta para fenilefrina determinadas em preparações isoladas de veia cava (Figura 5A). Com efeito, os parâmetros de Rmax (Figura 5B) e pD_2 (Figura 5C) obtidos a partir dessas curvas concentração vs resposta para fenilefrina não foram modificados significativamente pela orquidectomia ou pela reposição hormonal com testosterona.

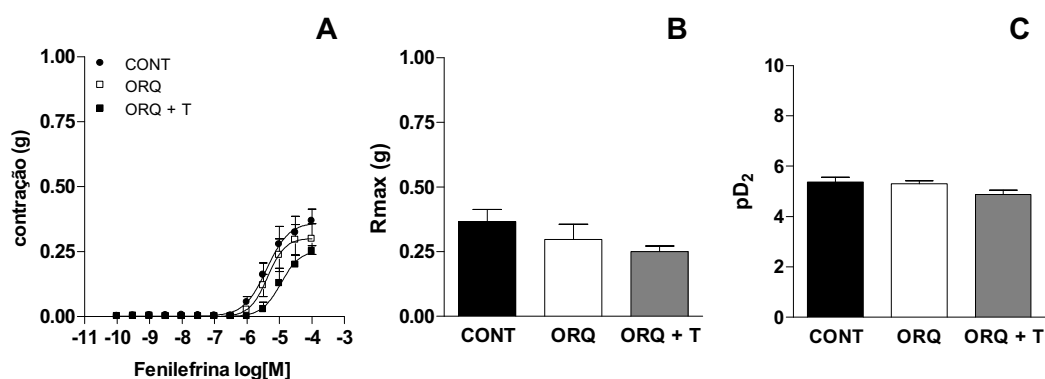


Figura 5- Curvas concentração vs resposta para fenilefrina (A), bem como valores de Rmax (B) e pD_2 (C) obtidos de preparações de veia cava isoladas de animais controles (CONT), orquidectomizados (ORQ) e orquidectomizados seguidos de reposição hormonal (ORQ+T). Valores apresentados em média $\pm$ E.P.M. de 6-8

preparações independentes

4.3.2 Veia porta

4.3.2.1 Cloreto de potássio

Em preparações isoladas de veia porta, a orquidectomia seguida ou não de reposição hormonal não produziu modificações significativas no padrão das curvas concentração vs resposta para o cloreto de potássio quando comparadas com as curvas obtidas de animais controles (Figura 6A). Com efeito, nenhuma diferença significativa foi observada em relação aos parâmetros de R_{max} (Figura 6B) e pD_2 (Figura 6C).

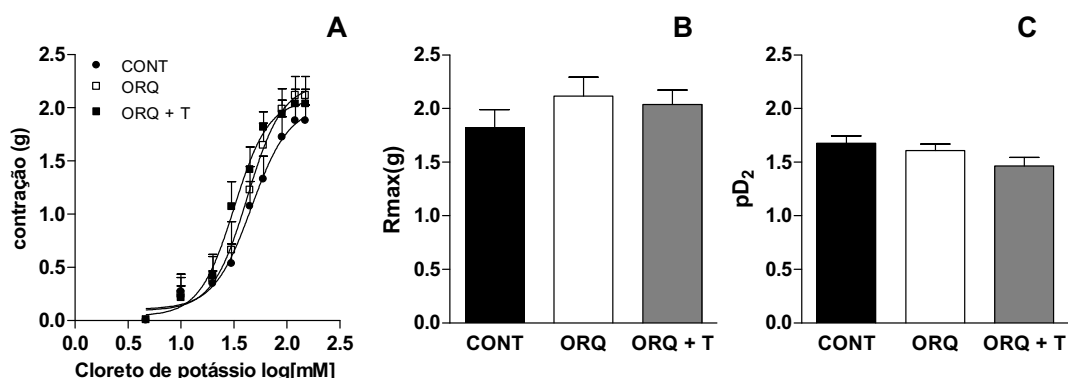


Figura 6- Curvas concentração vs resposta para cloreto de potássio (A), bem como valores de R_{max} (B) e pD_2 (C) obtidos de preparações de veia porta isoladas de animais controles (CONT), orquidectomizados (ORQ) e orquidectomizados seguidos de reposição hormonal (ORQ+T). Valores apresentados em média $\pm$ E.P.M. de 6-8 preparações independentes

4.3.2.2 Noradrenalina

A orquidectomia tampouco a reposição hormonal com testosterona não modificaram significativamente o padrão das curvas concentração vs resposta para noradrenalina determinadas em preparações isoladas de veia porta (Figura 7A). Com efeito, as preparações obtidas de animais orquidectomizados tratados ou não

com testosterona também não apresentaram diferenças significativas de R_{max} (Figura 7B) e pD_2 (Figura 7C) para noradrenalina.

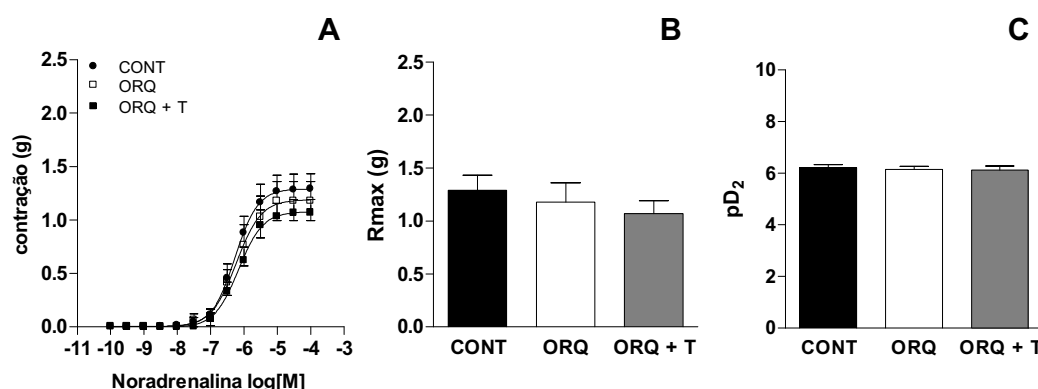


Figura 7- Curvas concentração vs resposta para noradrenalina (A), bem como valores de R_{max} (B) e pD_2 (C) obtidos de preparações de veia porta isoladas de animais controles (CONT), orquidectomizados (ORQ) e orquidectomizados seguidos de reposição hormonal (ORQ+T). Valores apresentados em média $\pm$ E.P.M. de 6-8 preparações independentes

4.3.2.3 Fenilefrina

A orquidectomia elevou as curvas concentração vs resposta para fenilefrina em preparações de veia porta, elevação esta completamente revertida pela reposição hormonal (Figura 8A). Estas modificações induzidas pela orquidectomia sobre o padrão das curvas concentração vs resposta para fenilefrina, bem como a reversão induzida pela reposição hormonal com testosterona ocorreram também na presença de L-NAME (Figura 8D) e L-NAME + indometacina (Figura 8G). Este aumento de resposta à fenilefrina induzido pela orquidectomia, revertido pela reposição hormonal, implicou em aumento significativo de R_{max} (Figuras 8B, 8E e 8H). Por outro lado, a orquidectomia promoveu aumento significativo de pD_2 para a fenilefrina somente na presença de L-NAME + indometacina (Figuras 8C, 8F e 8I).

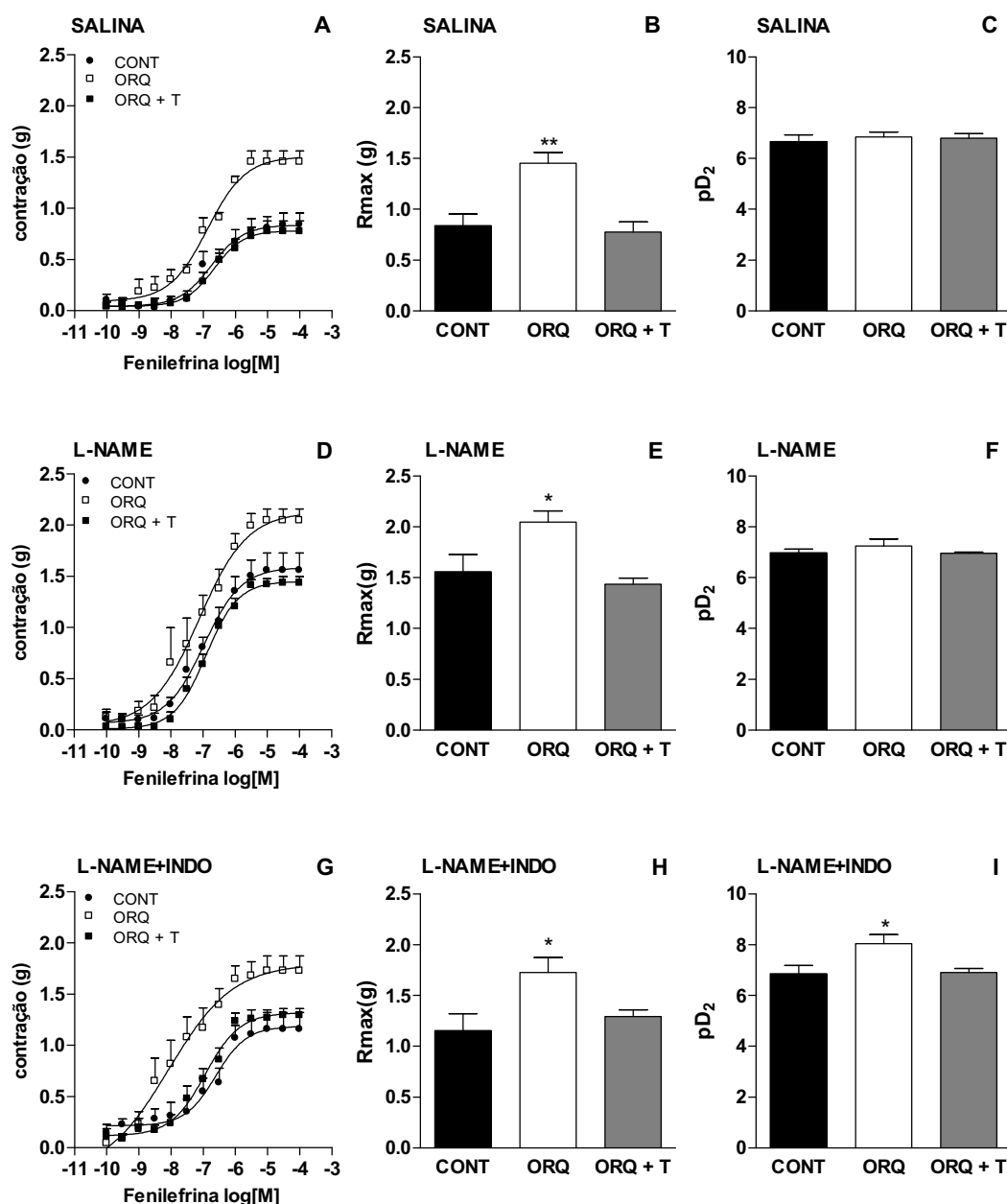


Figura 8- Curvas concentração vs resposta para fenilefrina (A, D e G), bem como valores de Rmax (B, E e H) e pD₂ (C, F e I) obtidos de preparações de veia porta isoladas de animais controles (CONT), orquidectomizados (ORQ) e orquidectomizados seguidos de reposição hormonal (ORQ+T). Estes parâmetros foram obtidos na ausência (A, B, C) ou na presença de L-NAME (D, E, F) ou L-NAME+indometacina (INDO) (G, H, I). Valores apresentados em média $\pm$ E.P.M. de 6-8 preparações independentes. *P<0,05; **P<0,01 em relação aos animais controles; ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni

Em contrapartida, este aumento da magnitude de resposta de veia porta à fenilefrina, induzido pela orquidectomia, foi completamente suprimido em preparações pré-tratadas simultaneamente com L-NAME e indometacina, na presença tanto do BQ-123 (Figura 9A) quanto do BQ-788 (Figura 9D). Com efeito, a orquidectomia não induziu diferenças significativas dos parâmetros Rmax (Figuras 9B e 9E) e pD_2 (Figuras 9C e 9F) para fenilefrina nas preparações de veia porta pré-tratadas simultaneamente com L-NAME e indometacina, na presença de BQ-123 ou BQ-788.

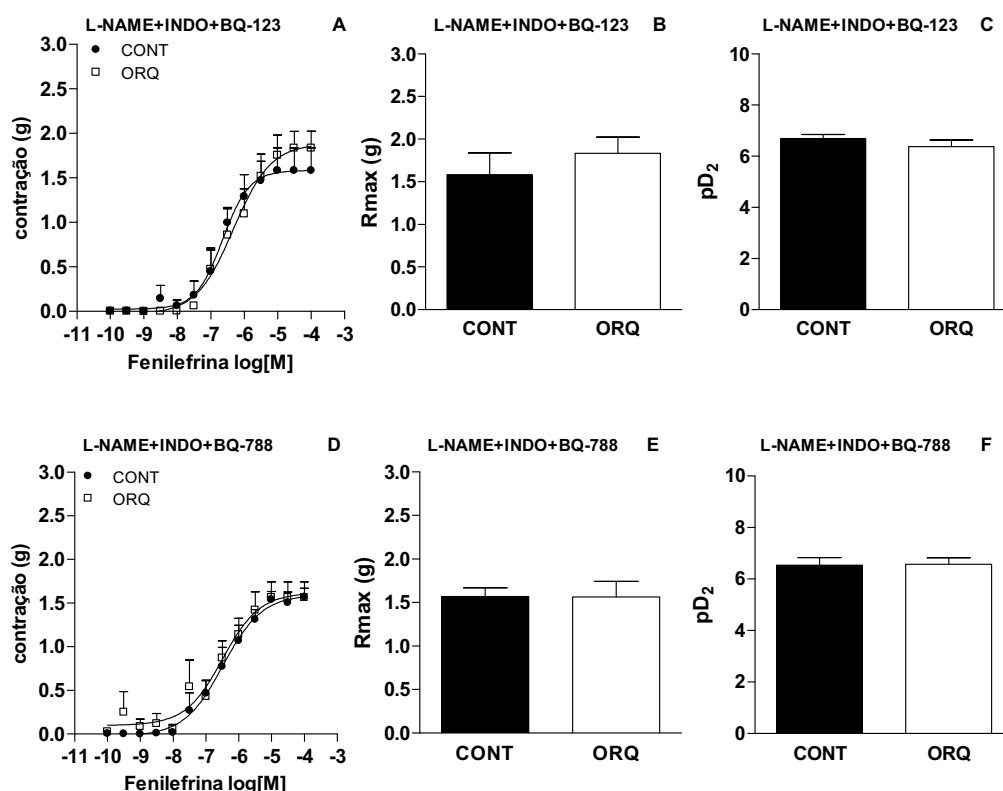


Figura 9- Curvas concentração vs resposta para fenilefrina (A e D), bem como valores de Rmax (B e E) e pD_2 (C e F) obtidos de preparações de veia porta isoladas de animais controles (CONT) e orquidectomizados (ORQ) previamente incubadas com L-NAME+indometacina (INDO), na presença de BQ-123 (A, B, C) ou BQ-788 (D, E, F). Valores apresentados em média $\pm$ E.P.M. de 6-8 preparações independentes

As modificações induzidas pela orquidectomia sobre as respostas das preparações de veia porta de rato à fenilefrina, observadas tanto na ausência quanto na presença de L-NAME ou L-NAME + indometacina, assim como na presença de BQ-123 e/ou BQ-788, persistiram após a remoção endotelial (Figura 10A). De fato, os valores de Rmax obtidos com fenilefrina em preparações deendotelizadas de veia porta de animais orquidectomizados foram significativamente maiores em comparação às preparações de animais controles (Figura 10B). Contudo, nenhuma modificação significativa de pD_2 foi observada nestas preparações deendotelizadas em decorrência da orquidectomia ou da reposição hormonal (Figura 10C).

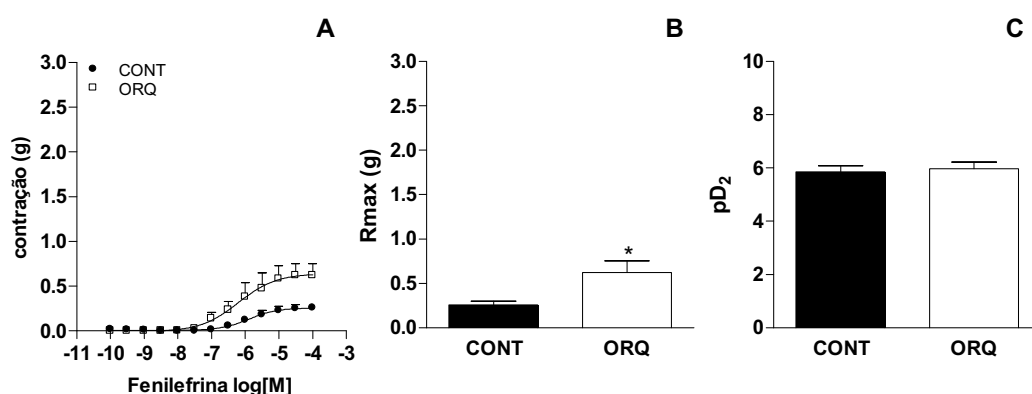


Figura 10- Curvas concentração vs resposta para fenilefrina (A), bem como valores de R_{max} (B) e pD_2 (C) obtidos de preparações de veia porta isoladas de animais controles (CONT) e orquidectomizados (ORQ). Valores apresentados em média $\pm$ E.P.M. de 6-8 preparações independentes. * $P < 0,05$; teste "t" de Student

Os resultados apresentados, sucintamente, mostram que a orquidectomia aumenta o R_{max} para fenilefrina em preparações de veia porta isolada de rato. A reposição hormonal de testosterona, por sua vez, reverte este aumento de R_{max} induzido pela orquidectomia nessas preparações. Este aumento de R_{max} ocorre na presença de L-NAME e indometacina, mas não na presença de antagonistas de receptores ET_A e ET_B . Por fim, a remoção endotelial não suprime este aumento de R_{max} induzido pela orquidectomia.

Discussão

5.1 Repercussões não-vasculares da orquidectomia, seguida ou não pela reposição hormonal com testosterona

A orquidectomia é um procedimento cirúrgico que reduz os níveis plasmáticos de testosterona, utilizado em experimentação animal como forma de simular as situações clínicas onde há queda dos níveis séricos de testosterona. Com efeito, foram avaliadas no presente estudo algumas repercussões fisiológicas desse procedimento cirúrgico em diversos órgãos e tecidos. Assim, observou-se inicialmente que os animais orquidectomizados tiveram um ganho de peso menor ao longo do período de estudo quando comparados com os animais controles ou orquidectomizados submetidos à reposição hormonal com testosterona. Este dado sugere indiretamente um menor ganho de massa muscular nestes animais, visto que a testosterona é capaz de produzir efeitos tanto anabolizantes quanto virilizantes (WANG et al., 2000).

A efetividade da orquidectomia, entretanto, foi demonstrada mais diretamente no presente estudo pela redução de peso dos órgãos sexuais acessórios hormônio-dependentes. Cabe ressaltar que a reposição hormonal com testosterona reverteu completamente a diminuição de peso induzida pela orquidectomia em vesículas seminais e próstata. Esta reversão, contudo, foi apenas parcial em ductos deferentes e epidídimos. Certamente, a reversão completa da atrofia dessas estruturas se daria após mais alguns dias de tratamento. Isto porque verificou-se em etapa preliminar de padronização da metodologia que tratamentos por períodos inferiores a 21 dias também revertem apenas parcialmente o peso das vesículas seminais e próstata, sugerindo-se que este é um fenômeno dose e tempo-dependente. O fato da reposição hormonal com testosterona reverter a redução do peso dos órgãos sexuais hormônio-dependentes também indica o envolvimento direto da testosterona nesta atrofia induzida pela orquidectomia.

A pesagem de órgãos hormônio-dependentes como forma de se avaliar a efetividade da orquidectomia e da reposição hormonal com testosterona é amplamente difundida na literatura (MATSUDA et al., 1994; McKEE et al., 2003; BLANCO-RIVERO, BALFAGÓN, FERRER, 2006). Todavia, paralelamente à pesagem desses órgãos, a efetividade da orquidectomia e da reposição hormonal também foi confirmada no presente estudo pela dosagem de testosterona

plasmática. Os resultados obtidos mostram que a orquidectomia reduziu drasticamente a concentração de testosterona no plasma dos animais estudados. Além disso, constatou-se que a reversão completa do peso dos órgãos sexuais acessórios hormônio-dependentes só é alcançada através de um esquema de reposição hormonal que resulta em níveis plasmáticos suprafisiológicos de testosterona. Da mesma forma, a reposição hormonal de testosterona proposta por Matsuda et al. (1994), capaz de reverter a atrofia dos órgãos sexuais acessórios hormônio-dependentes induzida pela orquidectomia, também produziu níveis plasmáticos suprafisiológicos de testosterona.

Vale ressaltar que a atuação da testosterona sobre os órgãos sexuais acessórios hormônio-dependentes produz ações bastante conhecidas, quantificáveis e que, portanto, servem como indicativo das ações desse hormônio sobre outros órgãos e tecidos. Assim, optou-se por utilizar um esquema de reposição hormonal que reverteresse a atrofia dos órgãos sexuais acessórios hormônio-dependentes, ainda que isto produzisse concentrações plasmáticas suprafisiológicas de testosterona. Isto porque, tratando-se de um estudo funcional de reatividade vascular, os efeitos da reposição hormonal com testosterona sobre os vasos são mais relevante que a concentração plasmática produzida por este tratamento em si.

No presente estudo, a orquidectomia promoveu ainda aumento de peso das glândulas adrenais, que foi revertido após a reposição hormonal com testosterona. Um aumento de peso das glândulas adrenais também foi descrito em ratos orquidectomizados por um período de oito semanas (MALENDOWICZ, 1986), sugerindo que se trata de um fenômeno adaptativo dessas glândulas frente à orquidectomia. Neste sentido, tem sido descrito em cobaias que baixos níveis de testosterona levam a uma maior ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal. Com isso, ocorre um aumento nos níveis de hormônio luteinizante (LH), paralelamente a um aumento na expressão de receptores de LH no córtex das glândulas adrenais. Isso aumenta a produção androgênica nesses tecidos, induzindo assim hiperplasia do córtex dessas glândulas (BERNICHTEIN et al., 2008).

5.2 Repercussões vasculares da orquidectomia, seguida ou não pela reposição hormonal com testosterona

Visando atender aos objetivos do presente estudo, as repercussões da orquidectomia seguida ou não de reposição hormonal com testosterona foram investigadas com mais ênfase nas veias porta e cava de ratos. Os resultados obtidos sugerem que as respostas contráteis de veias porta e cava ao cloreto de potássio, um agente que promove despolarização direta da musculatura lisa vascular, não são modificadas pela orquidectomia, tampouco pelo tratamento com testosterona. A preservação das respostas frente ao cloreto de potássio indica que a capacidade contrátil da musculatura lisa não foi afetada pela orquidectomia seguida ou não pela reposição com testosterona. Estes dados estão de acordo com estudos de reatividade realizados previamente nos quais a orquidectomia, seguida ou não pela reposição hormonal com testosterona, não modificou os padrões de resposta de aorta de ratos (MATSUDA et al., 1994; TEJERA et al., 1999) e artérias coronárias de porcos (FARHAT et al., 1995) ao cloreto de potássio.

Uma vez que a capacidade contrátil de veias porta e cava mostrou-se preservada após a orquidectomia seguida ou não pela reposição com testosterona, passou-se a estudar a resposta desses tecidos frente aos agonistas simpatomiméticos. Optou-se pelo emprego da noradrenalina neste estudo por se tratar de um neurotransmissor endógeno do sistema nervoso simpático que atua não-seletivamente através de adrenoreceptores α e β (HAYASHI, TODA, 1978). Utilizou-se também a fenilefrina, um agonista sintético com seletividade conhecida para adrenoreceptores α , receptores estes estreitamente relacionados com a contração de leitos vasculares (DIGGES, SUMMERS, 1983). Os resultados obtidos mostram que a orquidectomia seguida ou não de reposição hormonal com testosterona não modificou as respostas das preparações de veia porta ou de veia cava à noradrenalina. Contudo, a orquidectomia aumentou o R_{max} para fenilefrina em preparações de veia porta sem causar modificações desse parâmetro em veia cava de ratos.

Estes resultados são corroborados pela literatura, uma vez que diferentes repercussões da orquidectomia e da reposição hormonal com testosterona são relatadas, dependendo do leito vascular ou do agente vasoconstritor estudado.

Neste sentido, a orquidectomia não modificou significativamente as respostas vasomotoras de aortas isoladas de rato à noradrenalina (MATSUDA et al., 1994; WANG, SUN, WANG, 2002). Em contrapartida, a contração produzida pela clonidina em segmentos intactos de aortas de ratos orquidectomizados foi menor do que aquela produzida em segmentos de ratos controles. Isto sugere que os androgênios regulam positivamente as respostas dessa preparação a este agonista de adrenoreceptores α_2 (TEJERA et al., 1999). Por outro lado, a orquidectomia aumentou o Rmax para vasopressina em preparações de aorta de rato (STALLONE, 1994), sugerindo que os efeitos desse procedimento não se restringem aos agonistas simpatomiméticos. Além disso, a orquidectomia parece modificar a reatividade de outros territórios vasculares, além das artérias. Observou-se, dessa forma, que a orquidectomia pode aumentar as respostas do corpo cavernoso de rato à fenilefrina (MILLS, WIEDMEIER, STOPPER, 1992; REILLY, STOPPER, MILLS, 1997). No presente estudo, a reposição hormonal com testosterona foi capaz de reverter o aumento de Rmax observado nas preparações de veia porta isoladas de animais orquidectomizados frente à fenilefrina. Isto indica que as repercussões da orquidectomia observadas sobre a veia porta de rato também são decorrentes da redução drástica dos níveis séricos de testosterona. Esta observação também está respaldada na literatura uma vez que um protocolo de reposição hormonal idêntico ao realizado no presente trabalho, que também levou à concentrações plasmáticas suprafisiológicas de testosterona, reverteu a diminuição de reatividade da aorta torácica ao U-46619 decorrente da orquidectomia (MATSUDA et al., 1994). A reposição por um mês com testosterona restabeleceu ainda o tônus vascular de pequenas artérias cerebrais de resistência de ratos, diminuído pela orquidectomia (GEARY, KRAUSE, DUCKLES, 2000; GONZALES, KRAUSE, DUCKLES, 2004; GONZALES et al., 2005). A terapia de reposição hormonal com testosterona também foi responsável por aumentar a resposta vasoconstritora de artérias de resistência de homens frente à noradrenalina (MALKIN et al., 2006). Além disso, o aumento das respostas do corpo cavernoso de rato à fenilefrina induzido pela orquidectomia foi revertido por reposição hormonal que produz níveis suprafisiológicos de testosterona (MILLS, WIEDMEIER, STOPPER, 1992; REILLY, STOPPER, MILLS, 1997).

O aumento de resposta máxima observado em preparações de veia porta de

animais orquidectomizados frente à fenilefrina foi mantido mesmo após o bloqueio da enzima NOS. Isto sugere que o fenômeno observado não envolve NO produzido localmente. Estes dados parecem estar de acordo com a literatura uma vez que não se encontrou relatos do envolvimento direto do NO nas modificações de resposta vasomotora induzidas pela testosterona, ou pela privação desta, a longo prazo. Contudo, verificou-se em segmentos de aorta de ratos (KAUSER, RUBANYI, 1994) e coelhos (HAYASHI et al., 1992) que a liberação de NO é maior em fêmeas comparado aos machos. Além disso, em artéria mesentérica de ratos orquidectomizados tem sido descrito um aumento na produção de ânions superóxido (MARTIN et al., 2005), substâncias que reduzem a bioatividade do NO. Dessa forma, a relação entre os hormônios sexuais masculinos e a modulação do tônus vascular relacionada ao NO ainda não pode ser totalmente descartada.

Por outro lado, a literatura sugere uma relação mais estreita entre os hormônios sexuais masculinos e a modulação da reatividade de diversos leitos vasculares mediada por produtos da COX. Na presença de indometacina, artérias mesentéricas de resistência de ratos machos apresentaram uma menor resposta contrátil à fenilefrina, comparadas às obtidas em fêmeas. Além disso, observou-se que a orquidectomia reduziu as respostas das artérias de resistência destes ratos machos à fenilefrina (McKEE et al., 2003). Isto sugere que a testosterona reforça a participação de prostanóides vasoconstritores nas respostas destas artérias à fenilefrina. Por outro lado, Blanco-Rivero, Balfagón, Ferrer, (2006) sugerem que a produção de TXA₂ em células musculares lisas de artérias mesentéricas de ratos é aumentada pela orquidectomia. Esses autores sugerem ainda que este prostanóide está funcionalmente envolvido na resposta vasocostritora de artérias mesentéricas de ratos orquidectomizados à clonidina. As ações do TXA₂ também parecem ser importantes no aumento do tônus vascular de pequenas artérias cerebrais de resistência de ratos orquidectomizados, tratados por um mês com testosterona (GONZALES et al., 2005). Além disso, investigações mais específicas têm mostrado que os androgênios aumentam significativamente a densidade de receptores de TXA₂ em cultura de células de musculatura lisa de aorta (MASUDA, MATHUR, HALUSHKA, 1991; MATSUDA et al., 1993). Posteriormente, foi demonstrado que a orquidectomia reduz significativamente a densidade de receptores de TXA₂ e a resposta máxima de aorta frente à U-46619, reiterando a ação reguladora da

testosterona endógena sobre a expressão dos receptores de TXA₂ (MATSUDA et al., 1994).

Em contrapartida, os resultados obtidos no presente estudo mostram que o aumento de Rmax para fenilefrina, induzido pela orquidectomia em preparações de veia porta de ratos, persistiu ao tratamento com indometacina. Este resultado diverge dos estudos anteriormente mencionados, pois sugere que os prostanóides vasoconstritores não estão envolvidos nessa modificação de resposta à fenilefrina.

Descartada a participação do NO e prostanóides nas modificações de resposta de veia porta à fenilefrina observadas, voltou-se a atenção para outras substâncias vasoconstritoras produzidas localmente. Neste sentido decidiu-se investigar a participação da endotelina, pois aumentos nos níveis circulantes deste peptídeo vasoconstritor foram verificados em fêmeas masculinizadas que receberam altas doses de testosterona (van KESTEREN et al., 1998). De fato, parece que os níveis plasmáticos de testosterona estão diretamente correlacionados com os níveis de endotelina circulante em homens adultos (POLDERMAN et al., 1993). Por outro lado, tem sido relatado que em homens com hipogonadismo os níveis plasmáticos de endotelina estão aumentados, e uma tendência à redução desses níveis é observada após terapia de reposição hormonal com testosterona (KUMANOV, TOMOVA, KIRILOV, 2007). Este relato corrobora o presente estudo, pois o bloqueio tanto dos receptores ET_A quanto dos receptores ET_B aboliu totalmente o aumento de Rmax para fenilefrina induzido pela orquidectomia em preparações de veia porta de rato. Com efeito, isto sugere que a orquidectomia aumentou a participação da endotelina nas respostas vasoconstritoras de veia porta de rato à fenilefrina. Além disso, sugere que a mediação da endotelina sobre as ações da fenilefrina em veia porta de rato, aumentada pela orquidectomia, se dá através dos receptores tanto ET_A quanto ET_B cuja presença foi aí sugerida em estudos anteriores (FILIPPELLI et al., 1996; MACREZ, MOREL, MIRONNEAUS, 1999).

A endotelina foi descrita originalmente como sendo uma substância vasoconstritora produzida pelo endotélio vascular (YANAGISAWA et al., 1988). Contudo, alguns estudos identificaram a presença da enzima conversora de endotelina em células da musculatura lisa de anéis de veia umbilical (MAGUIRE et al., 1997) e de aortas ateroscleróticas de coelhos (GRANTHAM et al., 1998). Além disso, a presença endotelial não parece ser imprescindível nas modificações da

resposta contrátil de artérias mesentéricas de ratos frente à fenilefrina induzidas pela orquidectomia (McKEE et al., 2003). Por estas razões, decidiu-se investigar a participação endotelial nas modificações das respostas vasculares da veia porta à fenilefrina induzidas pela orquidectomia. Estudaram-se então as ações vasomotoras da fenilefrina em preparações de veia porta quimicamente deendotelizadas, obtidas de animais controles e orquidectomizados. Constatou-se, nesses experimentos, que o aumento de R_{max} para fenilefrina induzido pela orquidectomia persistiu à remoção endotelial. Concluiu-se, assim, que este fenômeno depende da produção sub-endotelial de endotelina.

Os resultados apresentados são bastante convincentes ao sugerir que as modificações de resposta contrátil induzidas pela orquidectomia em veia porta isolada de rato envolvem a produção sub-endotelial de endotelina. Cabe ressaltar que o emprego simultâneo de duas metodologias para a confirmação da remoção endotelial no presente estudo, sendo elas a análise funcional das respostas à clonidina e a análise morfológica realizada em duplo cego, minimizam a possibilidade de erro. Contudo, a ausência de resposta à clonidina em preparações apenas parcialmente deendotelizadas, embora improvável, pode ocorrer. Além disso, a análise histológica foi realizada através de avaliação subjetiva das lâminas, sendo que resquícios de células endoteliais poderiam ainda estar presentes nas preparações consideradas deendotelizadas. Com efeito, a exclusão definitiva da participação endotelial nesse fenômeno requer o emprego de outras estratégias metodológicas.

5.3 Significado fisiológico das repercussões vasculares da orquidectomia, seguida ou não pela reposição hormonal com testosterona

Ao analisar conjuntamente os diversos estudos que visam entender as repercussões cardiovasculares da orquidectomia seguida ou não de reposição hormonal com testosterona, é possível verificar que existem diferenças importantes dependendo do leito vascular estudado. Neste sentido, o aumento de R_{max} para a fenilefrina em veia porta de rato, observado no presente estudo, aparentemente é parte de uma extensa adaptação cardiovascular induzida pela orquidectomia. Neste sentido, espera-se que as repercussões da orquidectomia em leitos arteriais e

venosos sejam distintas, uma vez que esses leitos atuam de maneira diferente para garantir a homeostase hemodinâmica. Enquanto as artérias atuam, sobretudo, na manutenção da resistência vascular periférica, visto que por elas se dá a circulação centrífuga, as veias são os mais importantes territórios de capacitância. Assim, modificações de tônus das veias podem repercutir de forma determinante no retorno venoso.

Mesmo ao se considerar apenas o leito venoso, é possível notar que os efeitos da orquidectomia também parecem ser território-específicos. De fato, as alterações de respostas à fenilefrina induzidas pela orquidectomia foram observadas em veia porta mas não em veia cava de ratos. Este fato pode também ser atribuído às diferenças fisiológicas existentes entre esses dois leitos venosos. A veia porta é a principal responsável pelo escoamento do volume sangüíneo proveniente da região esplâncnica, descrita por Kjekshus et al. (2000) como o maior reservatório de sangue no organismo. Além disso, a venoconstrição ativa deste território vascular parece participar ao menos parcialmente do retorno venoso em situações que envolvem redistribuição do fluxo sangüíneo com conseqüente aumento do débito cardíaco, tais como o exercício e as modificações posturais (HAINSWORTH, DRINKHILL, 2006; ROTHE, 2006). Em contrapartida, a maior parte do sangue escoado pela veia cava, senão todo, é proveniente do território musculocutâneo. O retorno venoso a partir desse território vascular depende quase exclusivamente da bomba muscular, com uma discreta ou inexistente participação da venoconstrição ativa (SHERIFF et al., 1993). A ausência de uma significativa venoconstrição ativa neste território pode ser interpretada inclusive como um benefício fisiológico, uma vez que poderia levar a um aumento da resistência ao fluxo centrípeto, prejudicando o retorno venoso nas situações em que este estaria aumentado (ROWELL, 1993).

Outra observação importante do presente estudo é que as alterações de R_{max} observadas parecem ser agonista-específicas, uma vez que ocorreram apenas frente à fenilefrina. Com efeito, isto sugere que a orquidectomia evidencia os efeitos venoconstritores mediados por adrenoreceptores α . Porém, quando a estimulação se dá também sobre os adrenoreceptores β , como ocorre com o emprego da noradrenalina, esse aumento de R_{max} desaparece. Isso sugere que a estimulação de adrenoreceptores β compensa o aumento de R_{max} mediado pela estimulação dos adrenoreceptores α , observado em animais orquidectomizados.

Talvez este seja um mecanismo fisiológico auto-regulatório que atua no sentido de minimizar as alterações hemodinâmicas induzidas por reduções drásticas de testosterona, garantindo assim um adequado retorno venoso nestas situações extremas de variação hormonal.

Por fim, cabe ressaltar que as ações da orquidectomia observadas no presente estudo, embora muito interessantes, referem-se a uma pequena parte do sistema circulatório. Além disso, foi observada apenas em relação aos agonistas simpatomiméticos, que atuam em conjunto com outros neurotransmissores para a manutenção do tônus no território venoso. Com efeito, o presente estudo levanta uma série de indagações e possibilidades que serão verificadas posteriormente. Ou seja, o significado fisiológico dessas observações deverá ser desvendado empregando-se outras estratégias metodológicas. Porém, é justamente esta a principal contribuição do presente estudo, chamar a atenção para os efeitos das modificações drásticas dos níveis séricos de testosterona sobre o território venoso, tão precariamente conhecido.

Conclusões

- Os principais achados do presente estudo sugerem que a redução drástica dos níveis circulantes de testosterona induzida pela orquidectomia promoveu um aumento das ações vasomotoras da fenilefrina em veia porta, mas não em veia cava de rato.
- Paralelamente, a orquidectomia não modificou as respostas da noradrenalina tanto em veia porta quanto em veia cava de rato.
- Além disso, NO ou prostanóides produzidos localmente parecem não estar envolvidos nestas modificações de resposta de veia porta à fenilefrina, induzidas pela orquidectomia.
- Em contrapartida, a endotelina produzida sub-endotelialmente parece participar deste aumento de R_{max} para fenilefrina desencadeado pela orquidectomia em veia porta de rato.
- Por fim, esta mediação exercida pela endotelina parece envolver estimulação tanto de receptores ET_A quanto de receptores ET_B .

Referências

- ABDEL-SAYED, W.A.; ABBOUD, F.M.; BALLARD, D.R. Contribution of venous resistance to total vascular resistance in skeletal muscle. **Am. J. Physiol.**, v.218, n.5, p.1291-1295, 1970.
- ADAMS, M.R.; WILLAMS, J.K.; KAPLAN, J.R. Effects of androgens on coronary artery atherosclerosis and atherosclerosis-related impairment of vascular responsiveness. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.15, n.5, p.562-570, 1995.
- AKISHITA, M.; HASHIMOTO, M.; OHIKE, Y.; OGAWA, S.; IJIMA, K.; ETO, M.; OUCHI, Y. Low testosterone level is an independent determinant of endothelial dysfunction in men. **Hypertens. Res.**, v.30, n.11, p.1029-1034, 2007.
- BAKER, P.J.; RAMEY, E.R.; RAMWELL, P.W. Androgen-mediated sex differences of cardiovascular responses in rats. **Am. J. Physiol.**, v.235, n.2, p.H242-H246, 1978.
- BAUM, N.H.; CRESPI, C.A. Testosterone in elderly men. **Geriatrics**, v.62, n.9, p.15-18, 2007.
- BERNICHTEN, S.; PETRETTO, E.; JAMIESON, S.; GOEL, A.; AITMAN, T.J.; MANGION, J.M.; HUHTANIEMI, I.T. Adrenal gland tumorigenesis after gonadectomy in mice is a complex genetic trait driven by epistatic loci. **Endocrinology**, v.149, n.2, p.651-661, 2008.
- BERNINI, G.; VERSARI, D.; MORETTI, A.; VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; BARDINI, M.; TAURINO, C.; CANALE, D.; TADDEI, S.; SALVETTI, A. Vascular reactivity in congenital hypogonadal men before and after testosterone replacement therapy. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.91, n.5, p.1691-1697, 2006.
- BHARGAVA, K.P.; DHAWAN, K.N.; SAXENA, R.C. Enhancement of noradrenaline pressor responses in testosterone-treated cats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v.33, n.5, p.691-697, 1999.
- BHASIN, S.; CUNNINGHAM, G.R.; HAYES, F.J.; MATSUMOTO, A.M.; SNYDER, P.J.; SWERDLOFF, R.S.; MONTORI, V.M. Testosterone therapy in adult men with androgen deficiency syndromes: an endocrine society clinical practice guideline. **J.**

Clin. Endocrinol. Metab., v.91, n.6, p.1995-2010, 2006.

BLANCO-RIVERO, J.; BALFAGÓN, G.; FERRER, M. Orchidectomy modulates α_2 -adrenoceptor reactivity in rat mesenteric artery through increased thromboxane A_2 formation. **Vasc. Res.**, v.43, n.1, p.101-108, 2006.

CARDILLO, C.; KILCOYNE, C.M.; WACLAWIW, M.; CANNON, R.O. III.; PANZA, J.A. Role of endothelin in the increased vascular tone of patients with essential hypertension. **Hypertension**, v.33, n.2, p.753-758, 1999.

CEBALLOS, G.; FIGUEROA, L.; RUBIO, I.; GALLO, G.; GARCIA, A.; MARTINEZ, A.; YANEZ, R.; PEREZ, J.; MORATO, T.; CHAMORRO, G. Acute and nongenomic effects of testosterone on isolated and perfused rat heart. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v.33, n.5, p.691-697, 1999.

CHOU, T.M.; SUDHIR, K.; HUTCHISON, S.J.; KO, E.; AMIDON, T.M.; COLLINS, P.; CHATTERJEE, K. Testosterone induces dilation of canine coronary conductance and resistance arteries in vivo. **Circulation**, v.94, n.10, p.2614-2619, 1996.

COSTARELLA, C.E.; STALLONE, J.N.; RUTECKI, G.W.; WHITTIER, F.C. Testosterone causes direct relaxation of rat thoracic aorta. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.277, n.1, p.34-39, 1996.

CREWS, J.K.; KHALIL, R.A. Antagonistic effects of 17β -estradiol, progesterone, and testosterone on Ca^{2+} entry mechanisms of coronary vasoconstriction. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.19, n.4, p.1034-1040, 1999.

DEENADAYALU, V.P.; WHITE, R.E.; STALLONE, J.N.; GAO, X.; GARCIA, A.J. Testosterone relaxes coronary arteries by opening the large-conductance, calcium-activated potassium channel. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v.281, n.4, p. H1720-H1727, 2001.

DIGGES, K.G.; SUMMERS, R.J. Characterization of postsynaptic alpha-adrenoceptors in rat aortic strips and portal veins. **Br. J. Pharmacol.**, v.79, n.3, p.655-665, 1983.

- DING, A.Q.; STALLONE, J.N. Testosterone-induced relaxation of rat aorta is androgen structure specific and involves K^{1+} channel activation. **J. Appl. Physiol.**, v.91, n.6, p.2742-2750, 2001.
- DONEGAN, J.F. The physiology of the veins. **J. Physiol.**, v.55, n.3-4, p.226-245, 1921.
- DÖRNYEI, G.; MONOS, E.; KALEY, G.; KOLLER, A. Myogenic responses of isolated rat skeletal muscle venules: modulation by norepinephrine and endothelium. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v.271, 1 Pt 2, p.H267-H272, 1996.
- FARHAT, M.Y.; WOLFE, R.; VARGAS, R.; FOEGH, M.L.; RAMWELL, P.W. Effect of testosterone treatment on vasoconstrictor response of left anterior descending coronary artery in male and female pigs. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v.25, n.3, p.495-500, 1995.
- FILIPELLI, A.; FALCIANI, M.; PALLA, A.; D'AMICO, M.; VACCA, C.; ROSSI, F. Distribution of endothelin-1-receptor subtypes in rat portal vein. **Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 27,n.1, p.113-118, 1996.
- FUGIMOTO, R.; MORIMOTO, I.; MORITA, E.; SUGIMOTO, H.; ITO, Y.; ETO, S. Androgen receptors, 5 alpha-reductase activity and androgen-dependent proliferation of vascular smooth muscle cells. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v.50, n.3-4, p.169-174, 1994.
- FURNESS, J.B.; MARSHALL, J.M. Correlation of the directly observed responses of mesenteric vessels of the rat to nerve stimulation and noradrenaline with the distribution of adrenergic nerves. **J. Physiol.**, v.239, n.1, p.75-88, 1974.
- GEARY, G.G.; KRAUSE, D.N.; DUCKLES, S.P. Gonadal hormones affect diameter of male rat cerebral arteries through endothelium-dependent mechanisms. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v.279, n.2, p.H610-H618, 2000.
- GONZALES, R.J.; KRAUSE, D.N.; DUCKLES, S.P. Testosterone suppresses endothelium-dependent dilation of rat middle cerebral arteries. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 286, n.2, p.H552-H560, 2004.

GONZALES, R.J.; GHAFARI, A.A.; DUCKLES, S.P.; KRAUSE, D.N. Testosterone treatment increases thromboxane function in rat cerebral arteries. **Am. J. Physiol. Heart Cir. Physiol.**, v.289, n.2, p.H578-585, 2005.

GRANTHAM, J.A.; SCHIRGER, J.A.; WILLIAMSON, E.E.; HEUBLEIN, D.M.; WENBERG, P.W.; KIRCHENGAST, M.; MUENTER, K.; SUBKOWSKI, T.; BURNETT, J.C.JR. Enhanced endothelin-converting enzyme immunoreactivity in early atherosclerosis. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v.31, suppl 1, p.S22-S26, 1998.

GREENBERG, S.; GEORGE, W.R.; KADOWITZ, P.J.; WILSON, W.R. Androgen-induced enhancement of vascular reactivity. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v.52, n.1, p.14-22, 1974.

HAINSWORTH, R.; DRINKHILL, M.J. Counterpoint: Active venoconstriction is not important in maintaining or raising end-diastolic volume and stroke volume during exercise and orthostasis. **J. Appl. Physiol.**, v. 101, n.4, p.1264–1265, 2006.

HAYASHI, S.; TODA, N. Age-related changes in response of rabbit isolated aortae to vasoactive agents. **Br. J. Pharmacol.**, v.64, n.2, p.229-237, 1978.

HAYASHI, T.; FUKUTO, J.M.; IGNARRO, L.J.; CHAUDHURI, G. Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implication for atherosclerosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.89, n.23, p. 11259-11263, 1992.

HERMAN, S.M.; ROBINSON, J.T.; McCREDIE, R.J.; ADAMS, M.R.; BOYER, M.J.; CELERMAJER, D.S. Androgen deprivation is associated with enhanced endothelium-dependent dilatation in adult men. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.17, n.10, p.2004-2009, 1997.

HIGASHIURA, K.; MATHUR, R.S.; HALUSHKA, P.V. Gender-related differences in androgen regulation of thromboxane A₂ receptors in rat aortic smooth-muscle cells. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v.29, n.3, p.311-315, 1997.

HONDA, H.; UNEMOTO, T.; KOGO, H. Different mechanisms for testosterone-induced relaxation of aorta between normotensive and spontaneously hypertensive

rats. **Hypertension**, v. 34, n.6, p.1232-1236, 1999.

HORWITZ, K.B.; HORWITZ, L.D. Canine vascular tissues are targets for androgens, estrogens, progestins, and glucocorticoids. **J. Clin. Invest.**, v.69, n.4, p.750-758, 1982.

HUTCHISON, S.J.; SUDHIR, K.; CHOU, T.M.; SIEVERS, R.E.; ZHU, B.Q.; SUN, Y.P.; DEEDWANIA, P.C.; GLANTZ, S.A.; PARMLEY, W.W.; CHATTERJEE, K. et al. Testosterone worsens endothelial dysfunction associated with hypercholesterolemia and environmental tobacco smoke exposure in male rabbit aorta. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v.29, n.4, p.800-807, 1997.

IHLING, C.; SZOMBATHY, T.; BOHRMANN, B.; BROCKHAUS, M.; SCHAEFER, H.E.; LOEFFLER, B.M. **Circulation**, v.104, n.8, p.864-869, 2001.

JONES, R.D.; RUBAN, L.N.; MORTON, I.E.; ROBERTS, S.A.; ENGLISH, K.M.; CHANNER, K.S.; JONES, T.H. Testosterone inhibits the prostaglandin F_{2α}-mediated increase in intracellular calcium in A7r5 aortic smooth muscle cells: evidence of an antagonistic action upon stored-operated calcium channels. **J. Endocrinol.**, v.178, n.3, p.381-393, 2003.

JONES, R.D.; JONES, T.H.; CHANNER, K.S. The influence of testosterone upon vascular reactivity. **Eur. J. Endocrinol.**, v.151, n.1, p.29-37, 2004.

KAISER, G.A.; ROSS, J.; BRAUNWALD, E. Alpha and beta adrenergic receptor mechanisms in the systemic venous bed. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v.144, n.2, p.156-162, 1964.

KAUSER, K.; RUBANYI, G.M. Gender difference in bioassayable endothelium-derived nitric oxide from isolated rat aortae. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v.267, 6 Pt 2, p.H2311-H2317, 1994.

van KESTEREN, P.J.; KOOISTRA, T.; LANSINK, M.; van KAMP, G.J.; ASSCHEMAN, H.; GOOREN, L.J.; EMEIS, J.J.; VISCHER, U.M.; STEHOUWER, C.D. The effects of sex steroids on plasma levels of marker proteins of endothelial cell functioning. **Thromb. Haemost.**, v.79, n.5, p.1029-1033, 1998.

KJEKSHUS, H.; RISOE, C.; SCHOLZ, T.; SMISETH, O.A. Methods for assessing hepatic distending pressure and changes in hepatic capacitance in pigs. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 279, n.4, p.H1796-H1803, 2000.

KOHNO, M.; YASUNARI, K.; MURAKAWA, K.; YOKOKAWA, K.; HORIO, T.; FUKUI, T.; TAKEDA, T. Plasma immunoreactive endothelin in essential hypertension. **Am. J. Med.**, v.88, n.6, p.614-618, 1990.

KUMANOV, P.; TOMOVA, A.; KIRILOV, G. Testosterone replacement therapy in male hypogonadism is not associated with decrease of endotelin-1 levels. **Int. J. Androl.**, v.30, n.1, p.41-47, 2007.

LERMAN, A.; EDWARDS, B.S.; HALLETT, J.W.; HEUBLEIN, D.M.; SANDBERG, S.M.; BURNETT, J.C. JR. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. **N. Engl. J. Med.**, v.325, n.14, p.997-1001, 1991.

LIN, A.L.; GONZALES, R. JR.; SHAIN, S.A. Androgen directs apparent cytoplasmic and nuclear distribution of rat cardiovascular androgen receptors, **Arteriosclerosis**, v.5, n.6, p.659-667, 1985.

MACREZ, N.; MOREL, J.L.; MIRONNEAUS, J. Specific galpha11beta3gamma5 protein involvement in endothelin receptor-induced phosphatidylinositol hydrolysis and Ca²⁺ release in rat portal vein myocytes. **Mol. Pharmacol.**, v.55, n.4, p.684-692, 1999.

MADDOX, Y.T.; FALCON, J.G.; RIDINGER, M.; CUNARD, C.M.; RAMWELL, P.W. Endothelium-dependent gender differences in the response of the rat aorta. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v.240, n.2, p.392, 395, 1987.

MAGUIRE, J.J.; JOHNSON, C.M.; MOCKRIDGE, J.W.; DAVENPORT, A.P. Endothelin converting enzyme (ECE) activity in human vascular smooth muscle. **Br. J. Pharmacol.**, v.122, n.8, p.1647-1654, 1997.

MALENDOWICZ, L.K. Sex differences in adrenocortical structure and function. XXIII. Time-studies of the long-term effects of gonadectomy on rat adrenal cortex. **Exp. Clin. Endocrinol.**, v.88, n.1, p.6-12, 1986.

- MALKIN, C.J.; JONES, R.D.; JONES, T.H.; CHANNER, K.S. Effect of testosterone on ex vivo vascular reactivity in man. **Clin. Sci.**, v.111, n.4, p.265-274, 2006.
- MARTIN, D.S.; BILTOFT, S.; REDETZKE, R.; VOGEL, E. Castration reduces blood pressure and autonomic venous tone in male spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens.**, v.23, n.12, p.2229-2236, 2005.
- MASUDA, A.; MATHUR, R.; HALUSHKA, P.V. Testosterone increases thromboxane A₂ receptors in cultured rat aortic smooth muscle cells. **Circ. Res.**, v.69, n.3, p.638-643, 1991.
- MATSUDA, K.; MATHUR, R.S.; DUZIC, E.; HALUSHKA, P.V. Androgen regulation of thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptor expression in human erythroleukemia cells. **Am. J. Physiol.**, v. 265, 6 Pt 1, p. E928-E934, 1993.
- MATSUDA, K.; RUFF, A.; MORINELLI, T.A.; MATHUR, R.S.; HALUSHKA, P.V. Testosterone increases thromboxane A₂ receptor density and responsiveness in rat aortas and platelets. **Am. J. Physiol.**, v.267, 3 Pt 2, p.H887-H893, 1994.
- McGILL, H.C.JR.; SHERIDAN, P.J. Nuclear uptake of sex steroid hormones in the cardiovascular system of the baboon. **Circ. Res.**, v.48, n.2, p.238-44, 1981.
- McGRATH, J.C.; MONAGHAM, S.; TEMPLETON, A.G.B.; WILSON, V.G. Effects of basal an acetylcholine-induced release of endothelium-derived relaxing factor on contraction to α -adrenoceptor agonists in a rabbit artery and corresponding veins. **Br. J. Pharmacol.**, v.99, n.1, p.77-86, 1990.
- McKEE, A.P.; van RIPER, D.A.; DAVISON, C.A.; SINGER, H.A. Gender-dependent modulation of α_1 -adrenergic responses in rat mesenteric arteries. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v.284, n.5, p.H1737-H1743, 2003.
- MILLS, T.M.; WIEDMEIER, V.T.; STOPPER, V.S. Androgen maintenance of erectile function in the rat penis. **Biol. Reprod.**, v. 46, n.3, p.342-348, 1992.
- MÜLLER-RUCHHOLTZ, E.R.; LÖSCH, H.M.; GRUND, E.; LOCHNER, W. Effect of alpha adrenergic receptor stimulation on integrated systemic venous bed. **Pflugers.**

Arch., v.370, n.3, p.241-246, 1977a.

MÜLLER-RUCHHOLTZ, E.R.; LÖSCH, H.M.; GRUND, E.; LOCHNER, W. Effect of beta adrenergic receptor stimulation on integrated systemic venous bed. **Pflugers. Arch.**, v.370, n.3, p.247-251, 1977b.

MURPHY, J.G.; KHALIL, R.A. Decreased $[Ca^{2+}]_i$ during inhibition of coronary smooth muscle contraction by 17β -estradiol, progesterone, and testosterone. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.291, n.1, p.44-52, 1999.

ORSHAL, J. M.; KHALIL, R. A. Gender, sex hormones, and vascular tone. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v.286, n.2, p.R233-R249, 2004.

PEARSON, L.J.; YANDLE, T.G.; NICHOLLS, M.G.; EVANS, J.J. Regulation of endothelin-1 release from human endothelial cells by sex steroids and angiotensin-II. **Peptides**, v.29, n.6, p.1057-1061, 2008.

PERUSQUIA, M.; VILLALON, C.M. Possible role of Ca^{2+} channels in the vasodilating effect of 5β -dihydrotestosterone in rat aorta. **Eur. J. Pharmacol.**, v.371, n.2-3, p.169-178, 1999.

POLDERMAN, K.H.; STEHOUWER, C.D.; van KAMP, G.J.; DEKKER, G.A.; VERHEUGT, F.W.; GOOREN, L.J. Influence of sex hormones on plasma endothelin levels. **Ann. Intern. Med.**, v.188, n.6, p.429-432, 1993.

RAICHLIN, E.; PRASAD, A.; MATHEW, V.; KENT, B.; HOLMES, D.R. JR.; PUMPER, G.M.; NELSON, R.E.; LERMAN, L.O.; LERMAN, A. Efficacy and safety of atrasentan in patients with cardiovascular risk and early atherosclerosis. **Hypertension**, v.52, n.3, p.522-528, 2008.

REILLY, C.M.; STOPPER, V.S.; MILLS, T.M. Androgens modulate the α -adrenergic responsiveness of vascular smooth muscle in the corpus cavernosum. **J. Androl.**, v.18, n.1, p.26-31, 1997.

ROTHER, C.F. Venous system: physiology of the capacitance vessels. In: **Handbook of physiology: the cardiovascular system, peripheral circulation**. Washington, DC:

Am. Physiol. Soc., 1983. p.397-452.

ROTHER, C.F. Point: active venoconstriction is/is not important in maintaining or raising end-diastolic volume and stroke volume during exercise and orthostasis. **J. Appl. Physiol.**, v.101, n.4, p.1262-1264, 2006.

ROWELL, L.B. **Human Cardiovascular Control**. New York: Oxford University Press, 1993. 40p.

RUBANYI, G.M.; VANHOUTTE, P.M. Heterogeneity of endothelium-dependent responses to acetylcholine in canine femoral arteries and veins. **Blood Vessels**, v. 25, n.2, p.75-81, 1988.

SADER, M.A.; GRIFFITHS, K.A.; SKILTON, M.R.; WISHART, S.M.; HANDELSMAN, D.J.; CELERMAJER, D.S. Physiological testosterone replacement and arterial endothelial function in men. **Clin. Endocrinol.**, v.59, n.1, p.62-67, 2003.

SAINANI, G.S.; MARU, V.G.; MEHRA, A.P. Role of endothein-1 in genesis of coronary artery disease. **Indian Heart J.**, v.57, n.2, p.121-127, 2005.

SCHROEDER, K.; MORINELLI, T.A.; MASUDA, A.; MATSUDA, K.; MATHUR, R.S.; HALUSHKA, P.V. Testosterone treatment enhances thromboxane A₂ mimetic induced coronary artery vasoconstriction in guinea pigs. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 24, suppl 1, p.50-52, 1994.

SEIDMAN, S.N. Androgens and the aging male. **Psychopharmacol. Bull.**, v.40, n.4, p.205-218, 2007.

SHERIFF, D.D.; ZHOU, X.P.; SCHER, A.M.; ROWELL, L.B. Dependence of cardiac filling pressure on cardiac output during rest and dynamic exercise in dogs. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v.265, 1 Pt 2, p.H316-H322, 1993.

SHIBAMOTO, T.; CUI, S.; RUAN, Z.; KURATA, Y. Effects of norepinephrine and histamine on vascular resistance in isolated perfused mouse liver. **Jpn. J. Physiol.**, v.55, n.2, p.143-148, 2005.

SHIMAMURA, K.; TOBA, M.; KIMURA, S.; OHASHI, A.; KITAMURA, K. Clonidine

induced endothelium-dependent tonic contraction in circular muscle of the rat hepatic portal vein. **J. Smooth Muscle Res.**, v.42, n.2-3, p.63-74, 2006.

SIMONCINI, T.; GENAZZANI, A. R. Non-genomic actions of sex steroid hormones. **Eur. J. Endocrinol.**, v.148, n.3, p.281-292, 2003.

STALLONE, J.N. Sex differences in nitric oxide-mediated attenuation of vascular reactivity to vasopressin are abolished by gonadectomy. **Eur. J. Pharmacol.**, v.259, n.3, p.273-283, 1994.

STUMPF, W.E. Steroid hormones and the cardiovascular system: direct actions of estradiol, progesterone, testosterone, gluco- and mineralocorticoids, and solatriol (vitamin D) on central nervous regulatory and peripheral tissues. **Experientia**, v.46, n.1, p.13-25, 1990.

SUTTER, M.C. The mesenteric-portal vein in research. **Pharmacol. Rev.**, v.42, n.4, p.287-325, 1990.

TATCHUM-TALOM, R.; MARTEL, C.; MARETTE, A. Effects of ethinyl estradiol, estradiol and testosterone on hindlimb endothelial function in vivo. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v.39, n.4, p.496-502, 2002.

TEJERA, N.; BALFAGÓN, G.; MARÍN, J.; FERRER, M. Gender differences in the endothelial regulation of α_2 -adrenoceptor-mediated contraction in the rat aorta. **Clin. Sci.**, v.97,n.1, p.19-25, 1999.

TEOH, H.; QUAN, A.; MAN, R. Y. Acute impairment of relaxation by low levels of testosterone in porcine coronary arteries. **Cardiovasc. Res.**, v.45, n.4, p.1010-1018, 2000a.

TEOH, H.; QUAN, A.; LEUNG, S.W.S.; MAN, R.Y.K. Differential effects of 17beta-estradiol and testosterone on the contractile responses of porcine coronary arteries. **Br. J. Pharmacol.**, v.129, n.7, p.1301-1308, 2000b.

TEP-AREENAN, P.; KENDALL, D.A.; RANDALL, M.D. Testosterone-induced vasorelaxation in the rat mesenteric arterial bed is mediated predominantly via

potassium channels. **Br. J. Pharmacol.**, v.135, n.3, p.735-740, 2002.

TRAISH, A.M.; MÜLLER, R.E.; WOTIZ, H.H. Binding of 7 alpha, 17 alpha-dimethyl-19-nortestosterone (mibolerone) to androgen and progesterone receptors in human and animal tissues. **Endocrinology**, v.118, n.4, p.1327-1333, 1986.

VALLE, R.M.R. **Desenvolvimento e sensibilidade farmacológica da vesícula seminal do rato – influência da castração e do tratamento androgênico**. 1976. 87 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

VALLE, R.M.; ABREU, L.C.; PICARELLI, Z.P.; VALLE, J.R. Influence of castration upon trophism and reactivity of rat seminal vesicles. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.15, n.1, p.49-53, 1982.

VERMEULEN, A.; RUBENS, R.; VERDONCK, L. Testosterone secretion and metabolism in male senescence. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.34, n.4, p.730-735, 1972.

WANG, C.; SWERDLOFF, R.S.; IRANMANESH, A.; DOBS, A.; SNYDER, P.J.; CUNNIGAN, G.; MATSUMOTO, A.M.; WEBER, T.; BERMAN, N.. Transdermal testosterone gel improves sexual function, mood, muscle strength, and body composition parameters in hypogonadal men. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.85, n.8, p.2839-2853, 2000.

WANG, W.; SUN, C.; WANG, X. Alteration of vascular response to norepinephrine, calcitonin gene-related peptide, and acetylcholine in orchidectomized rats. **Acta. Pharmacol. Sin.**, v.23, n.11, p.985-990, 2002.

WEBB, C.M.; MCNEILL, J.G.; HAYWARD, C.S.; de ZEIGLER, D.; COLLINS, P. Effect of testosterone on coronary vasomotor regulation in men with coronary heart disease. **Circulation**, v.100, n.16, p.1690-1696, 1999.

WHITE, R.M.; RIVERA, C.O.; DAVISON, C.A. Nitric oxide-dependent and -independent mechanisms account for gender differences in vasodilation to acetylcholine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.292, n.1, p.375-380, 2000.

WOODLEY, N.; BARCLAY, J.K. Cultured endothelial cells from distinct vascular areas show differential responses to agonists. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v.72, n.9, p.1007-1012, 1994.

WU, F.C.W.; ECKARDSTEIN, A.V. Androgens and coronary artery disease. **Endocrine Reviews**, v.24, n.2, p.183-217, 2003.

YANAGISAWA, M.; KURIHARA, 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**, v.332, n.6163, p.411-415, 1988.

YILMAZ, B.; CANPOLAT, S.; SANDAL, S.; AKPOLAT, N.; KUTLU, S.; IHLAN, N.; KELESTIMUR, H. Paint thinner exposure inhibits testosterone synthesis and secretion in a reversible manner in the rat. **Reprod. Toxicol.**, v.22, n.4, p.791-796, 2006.

YUE, P.; CHATTERJEE, K.; BEALE, C.; POOLE-WILSON, P.A.; COLLINS, P. Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta. **Circulation**, v.91, n.4, p.1154-1160, 1995.

ZITZMANN, M.; BRUNE, M.; NIESCHLAG, E. Vascular reactivity in hypogonadal men is reduced by androgen substitution. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.87, n.11, p.5030-5037, 2002.

Apêndices

Apêndice A - Descrição dos diferentes esquemas de reposição hormonal avaliados em etapa preliminar de padronização da reposição hormonal com testosterona, bem como dos resultados obtidos referentes às pesagens de órgãos sexuais acessórios hormônio-dependentes e glândulas adrenais

Quadro 1 - Protocolos de reposição hormonal de testosterona utilizados na padronização da metodologia de tratamento dos animais

PROTOCOLO	DURAÇÃO DO TRATAMENTO (semanas)	INTERVALO ENTRE AS DOSES (dias)	DOSE (mg/kg peso do animal)
1	2	5	10,0
2	2	2	10,0
3	3	8	5,0
4	3	8	7,5
5	3	8	10,0
6	3	5	10,0

Droga utilizada: propionato de testosterona; **Via de administração:** intramuscular; **Início do tratamento:** 23º dia após a orquidectomia

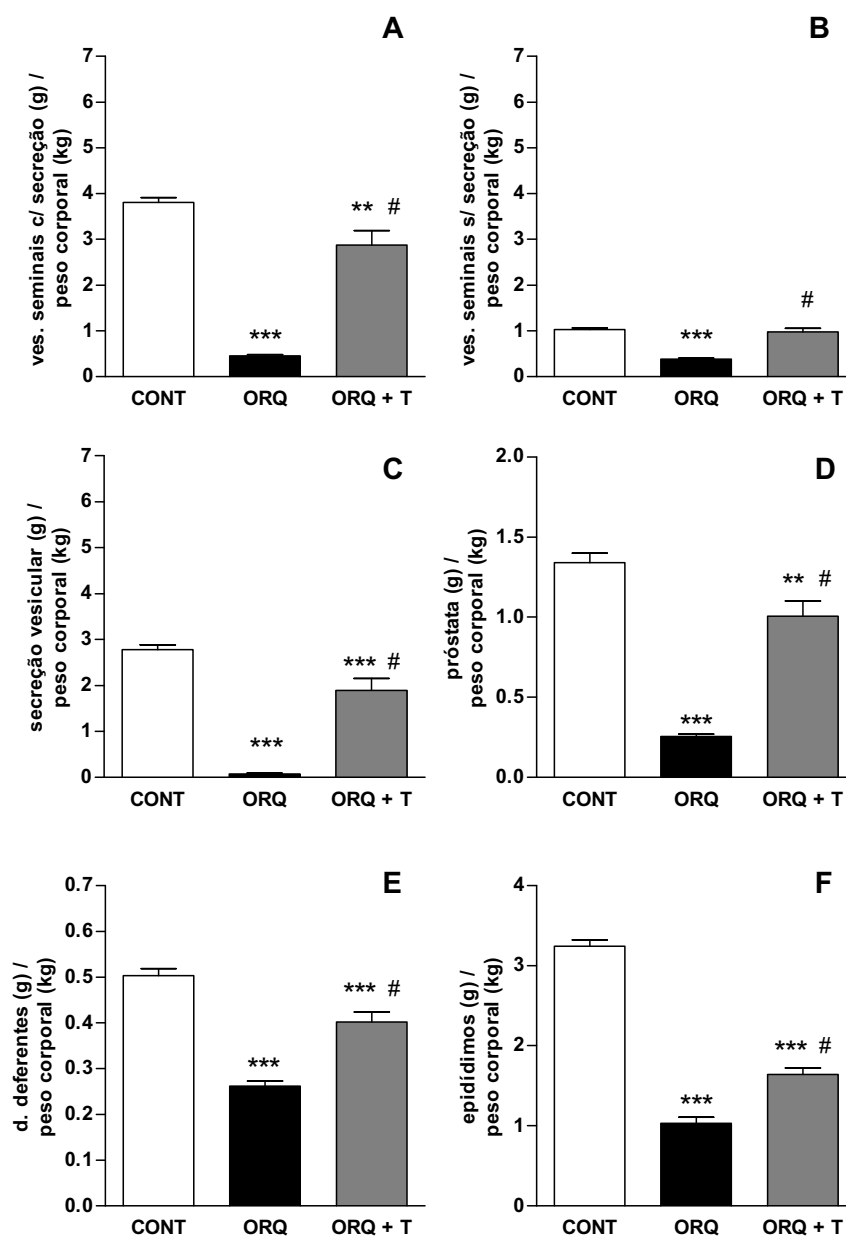


Figura 1- Peso da vesícula seminal com (A) e sem secreção (B), bem como da secreção seminal (C), além da próstata (D), ductos deferentes (E) e epidídimos (F) obtidos de animais controles (CONT), orquidectomizados (ORQ) e orquidectomizados submetidos à reposição de testosterona (ORQ+T) descrita no protocolo 1 do Quadro 1. Barras representam a média $\pm$ E.P.M. de 6-8 preparações independentes. **P<0,01, ***P<0,001 em relação aos animais CONT; #P<0,001 em relação aos animais ORQ; ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni

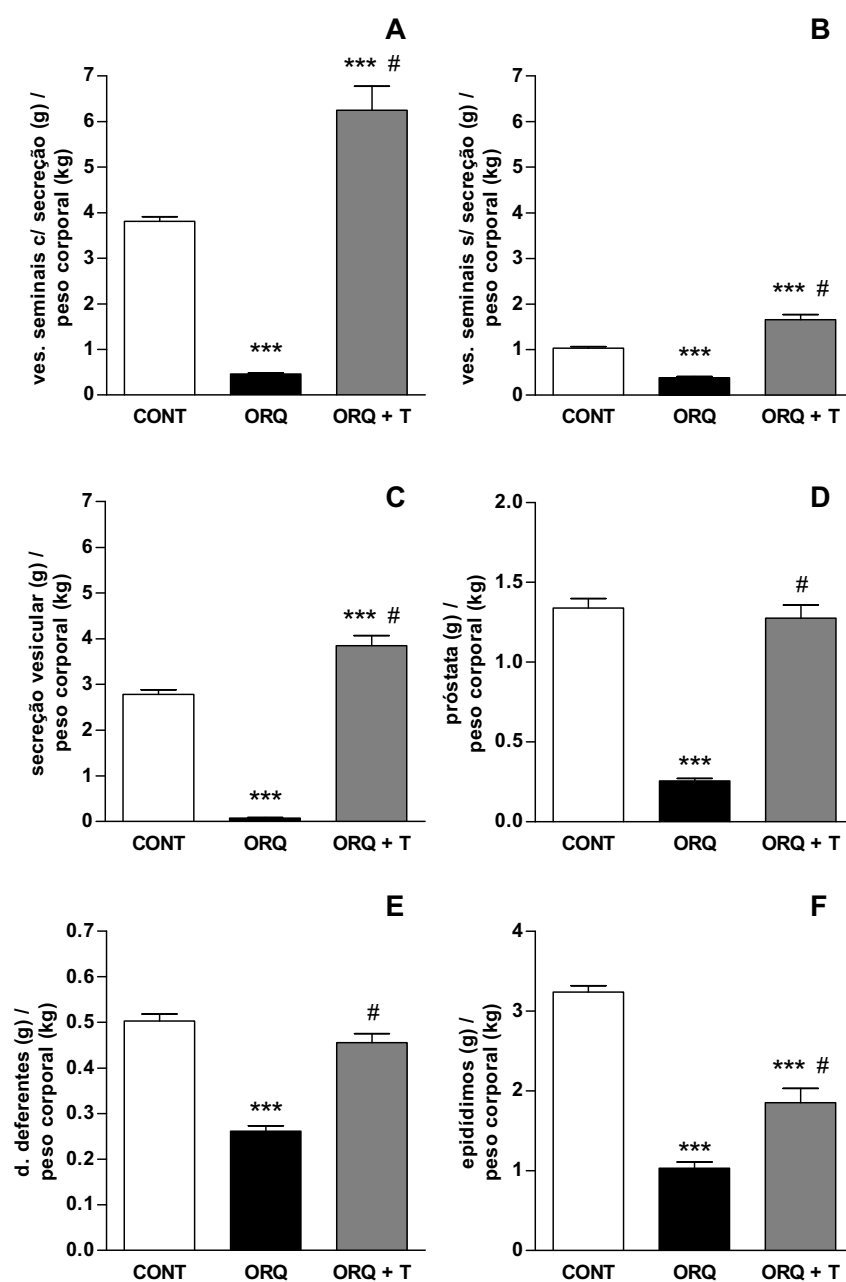


Figura 2- Peso da vesícula seminal com (A) e sem secreção (B), bem como da secreção seminal (C), além da próstata (D), ductos deferentes (E) e epidídimos (F) obtidos de animais controles (CONT), orquidectomizados (ORQ) e orquidectomizados submetidos à reposição de testosterona (ORQ+T) descrita no protocolo 2 do Quadro 1. Barras representam a média $\pm$ E.P.M. de 6-8 preparações independentes. *** $P < 0,001$ em relação aos animais CONT; # $P < 0,001$ em relação aos animais ORQ; ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni

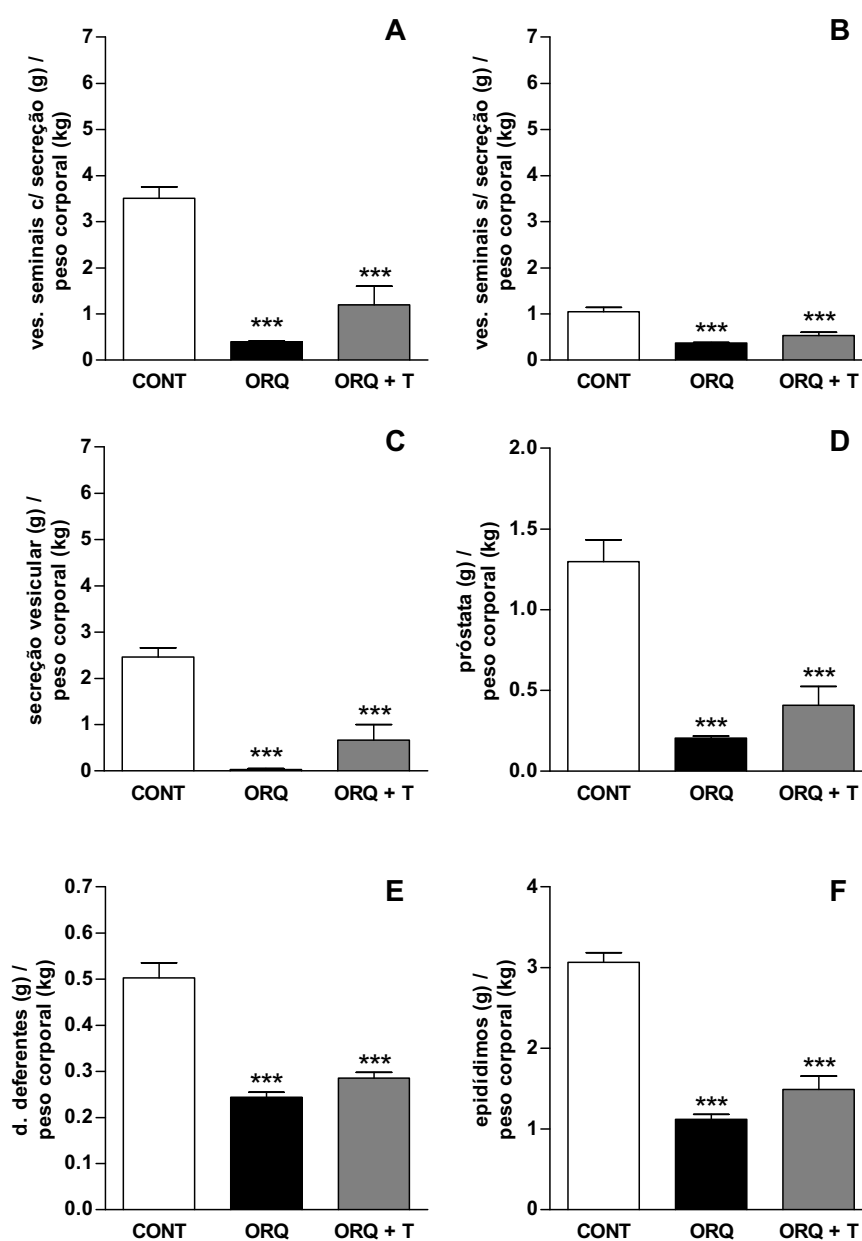


Figura 3- Peso da vesícula seminal com (A) e sem secreção (B), bem como da secreção seminal (C), além da próstata (D), ductos deferentes (E) e epidídimos (F) obtidos de animais controles (CONT), orquidectomizados (ORQ) e orquidectomizados submetidos à reposição de testosterona (ORQ+T) descrita no protocolo 3 do Quadro 1. Barras representam a média $\pm$ E.P.M. de 6-8 preparações independentes. *** $P < 0,001$ em relação aos animais CONT; ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni

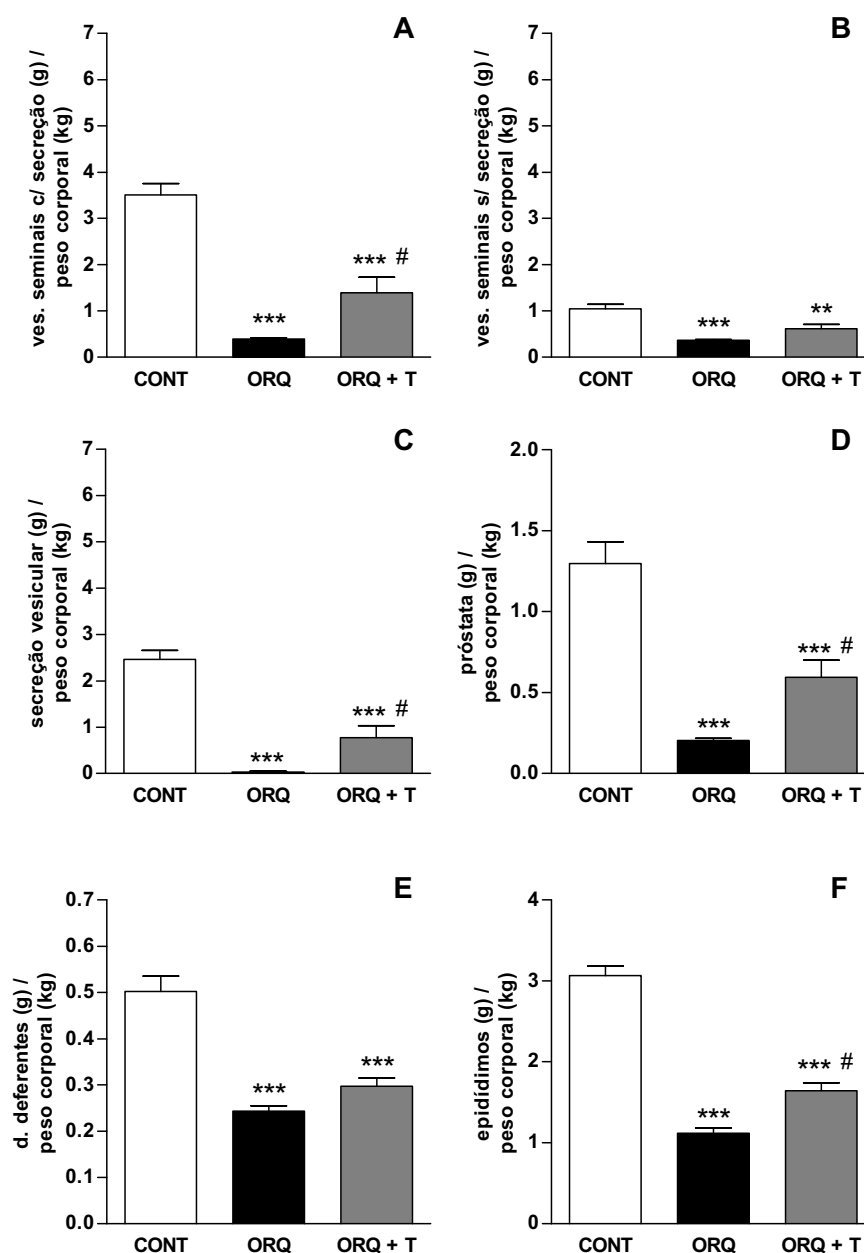


Figura 4- Peso da vesícula seminal com (A) e sem secreção (B), bem como da secreção seminal (C), além da próstata (D), ductos deferentes (E) e epidídimos (F) obtidos de animais controles (CONT), orquidectomizados (ORQ) e orquidectomizados submetidos à reposição de testosterona (ORQ+T) descrita no protocolo 4 do Quadro 1. Barras representam a média $\pm$ E.P.M. de 6-8 preparações independentes. **P<0,01, ***P<0,001 em relação aos animais CONT; #P<0,05 em relação aos animais ORQ; ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni

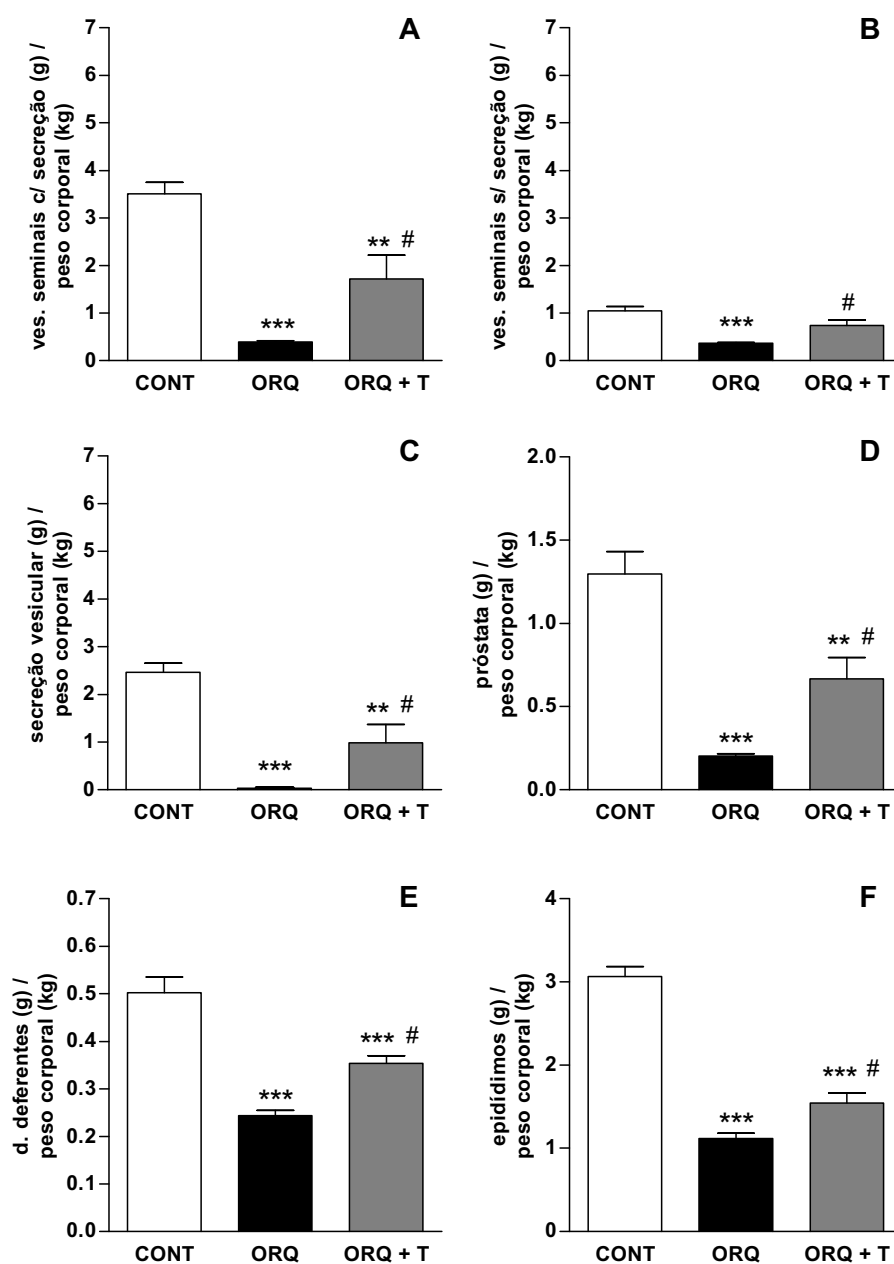


Figura 5- Peso da vesícula seminal com (A) e sem secreção (B), bem como da secreção seminal (C), além da próstata (D), ductos deferentes (E) e epidídimos (F) obtidos de animais controles (CONT), orquidectomizados (ORQ) e orquidectomizados submetidos à reposição de testosterona (ORQ+T) descrita no protocolo 5 do Quadro 1. Barras representam a média $\pm$ E.P.M. de 6-8 preparações independentes. **P<0,01, ***P<0,001 em relação aos animais CONT; #P<0,05 em relação aos animais ORQ; ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni

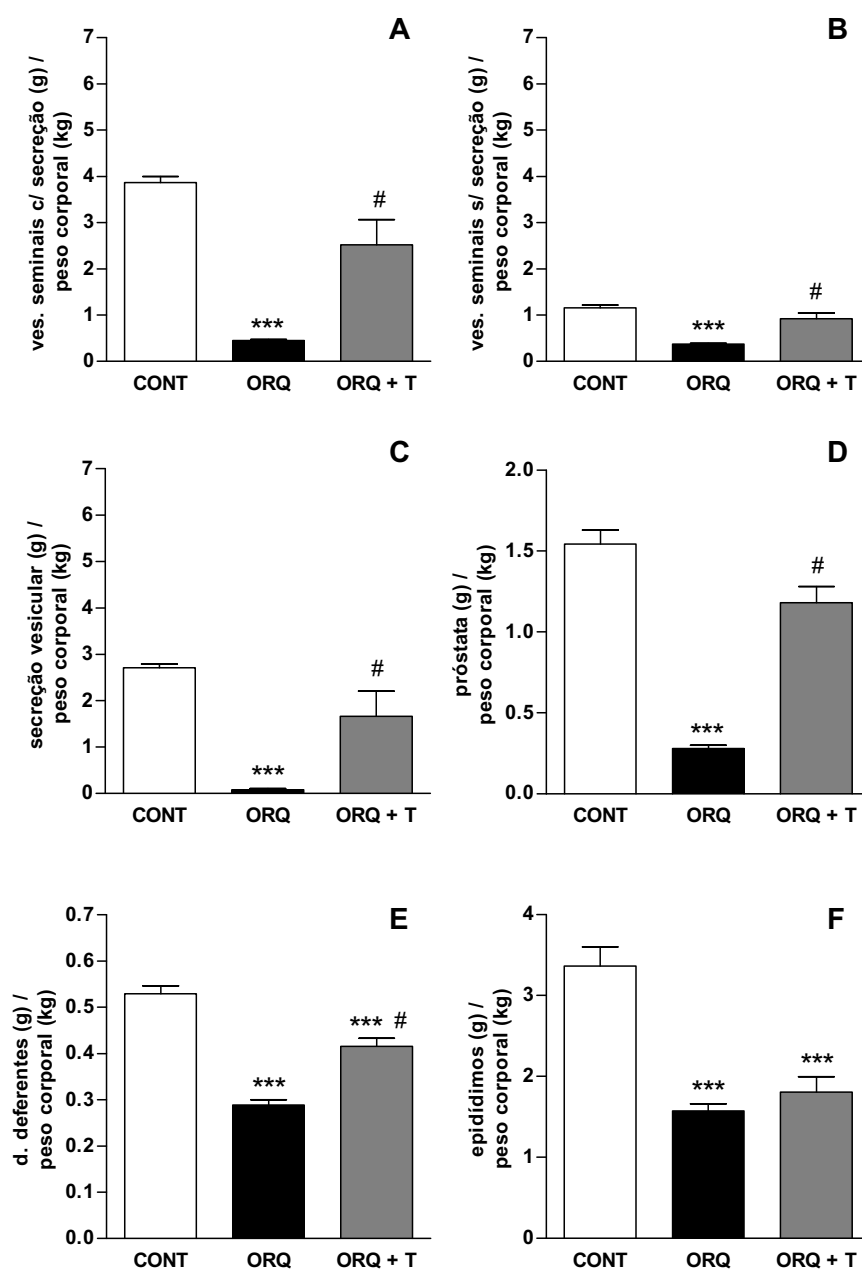


Figura 6- Peso da vesícula seminal com (A) e sem secreção (B), bem como da secreção seminal (C), além da próstata (D), ductos deferentes (E) e epidídimos (F) obtidos de animais controles (CONT), orquidectomizados (ORQ) e orquidectomizados submetidos à reposição de testosterona (ORQ+T) descrita no protocolo 6 do Quadro 1. Barras representam a média $\pm$ E.P.M. de 6-8 preparações independentes. *** $P < 0,001$ em relação aos animais CONT; # $P < 0,01$ em relação aos animais ORQ; ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni

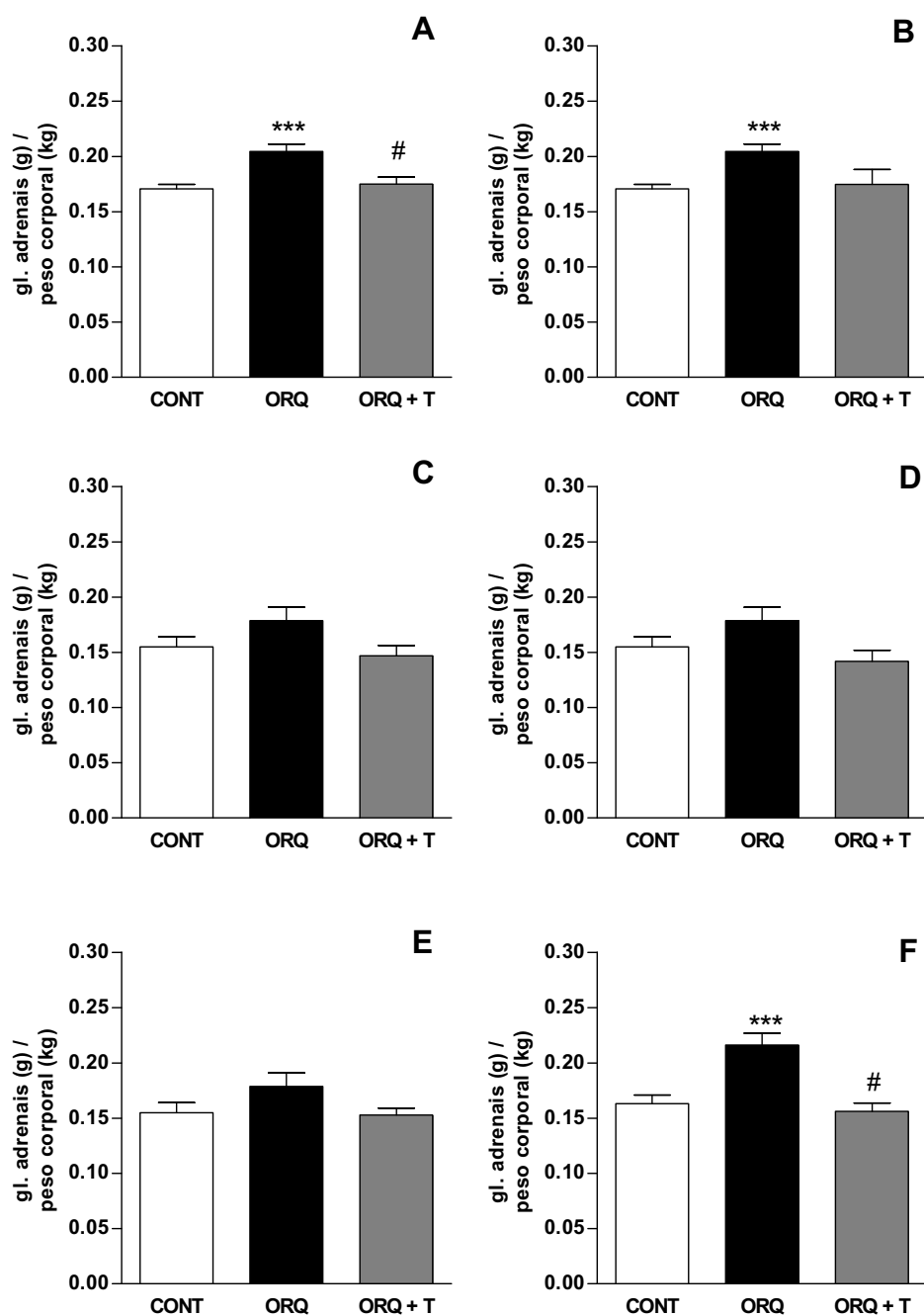


Figura 7- Peso das glândulas adrenais obtidos de animais controles (CONT), orquidectomizados (ORQ) e orquidectomizados submetidos à reposição de testosterona (ORQ+T) descrita no protocolo 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E) e 6 (F) do Quadro 1. Barras representam a média $\pm$ E.P.M. de 6-8 preparações independentes. *** $P < 0,001$ em relação aos animais CONT; # $P < 0,001$ em relação aos animais ORQ; ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni

Apêndice B – Estudos complementares de reatividade vascular de veias porta e cava frente aos agonistas simpatomiméticos noradrenalina e fenilefrina

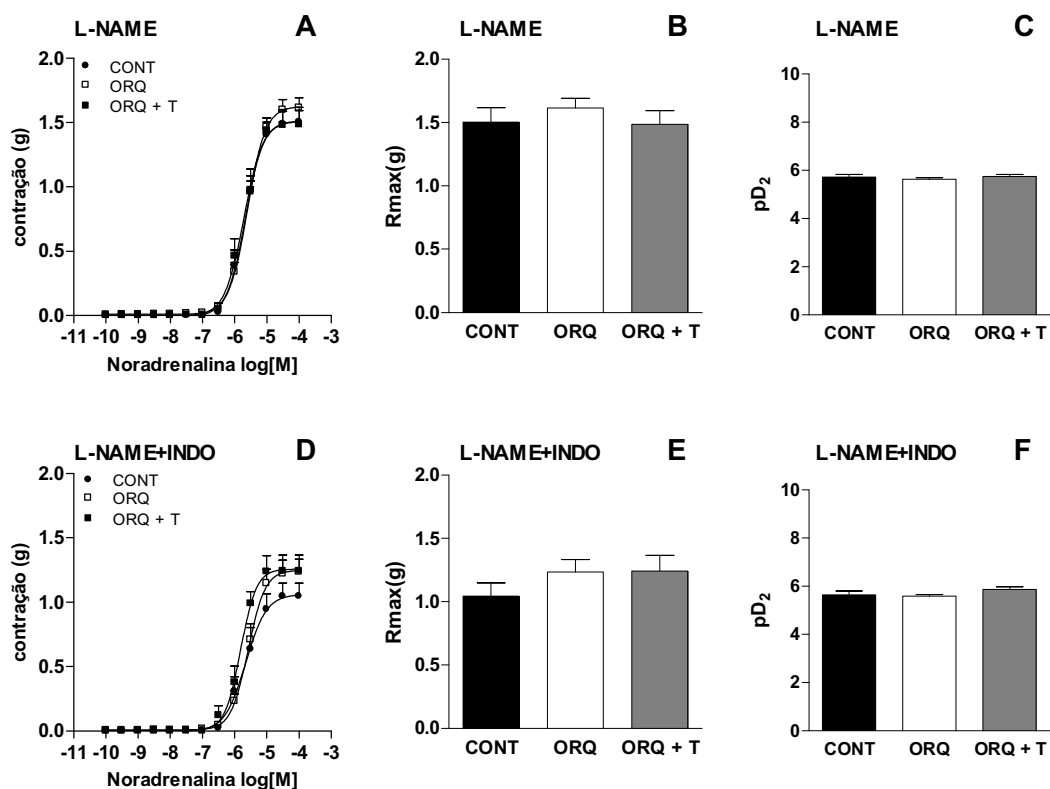


Figura 1- Curvas concentração vs resposta para noradrenalina (A e D), bem como valores de Rmax (B e E) e pD₂ (C e F) obtidos de preparações de veia cava isoladas de animais controles (CONT), orquitectomizados (ORQ) e orquitectomizados seguidos de reposição hormonal (ORQ+T). Estes parâmetros foram obtidos na presença de L-NAME (A, B, C) ou L-NAME+indometacina (INDO) (D, E, F). Valores apresentados em média ± E.P.M. de 6-8 preparações independentes

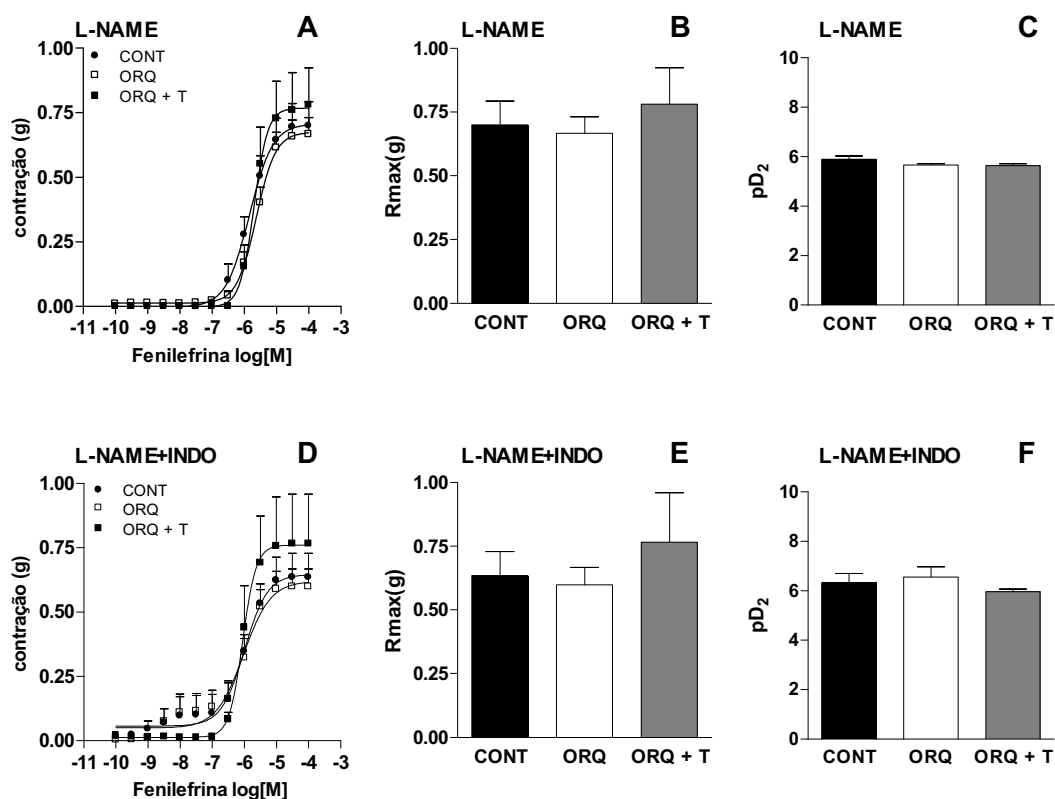


Figura 2- Curvas concentração vs resposta para fenilefrina (A e D), bem como valores de Rmax (B e E) e pD₂ (C e F) obtidos de preparações de veia cava isoladas de animais controles (CONT), orquidectomizados (ORQ) e orquidectomizados seguidos de reposição hormonal (ORQ+T). Estes parâmetros foram obtidos na presença de L-NAME (A, B, C) ou L-NAME+indometacina (INDO) (D, E, F). Valores apresentados em média $\pm$ E.P.M. de 6-8 preparações independentes

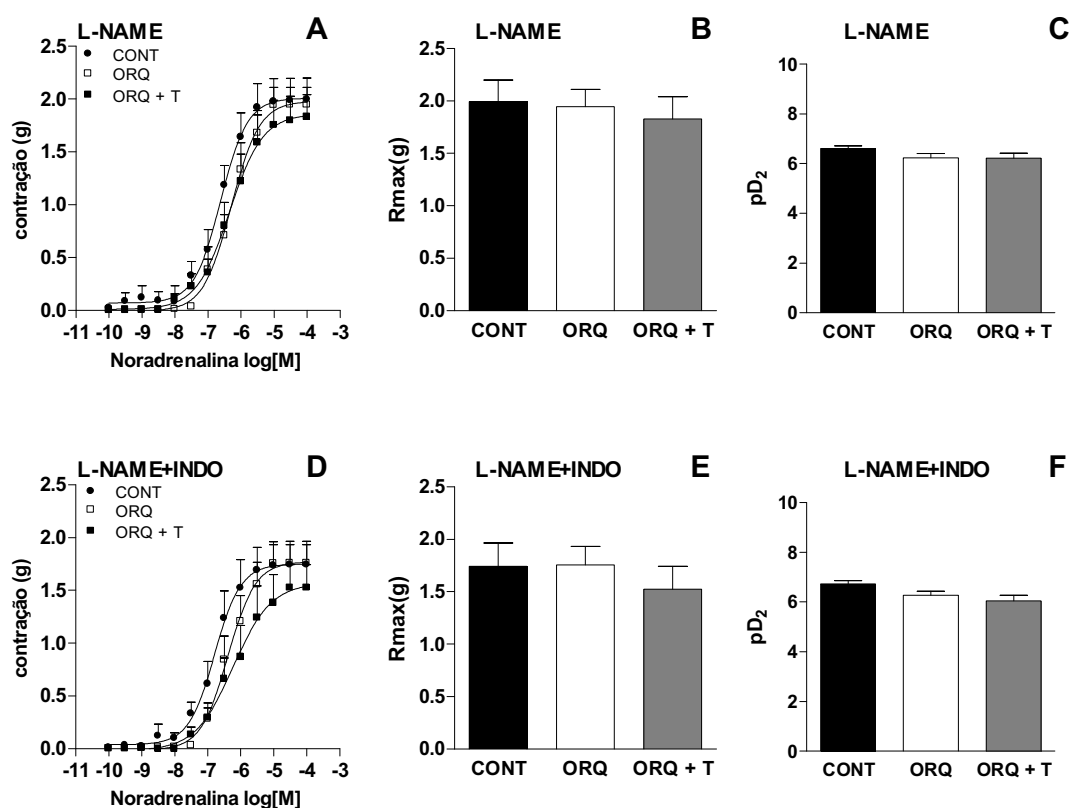


Figura 3- Curvas concentração vs resposta para noradrenalina (A e D), bem como valores de Rmax (B e E) e pD₂ (C e F) obtidos de preparações de veia porta isoladas de animais controles (CONT), orquidectomizados (ORQ) e orquidectomizados seguidos de reposição hormonal (ORQ+T). Estes parâmetros foram obtidos na presença de L-NAME (A, B, C) ou L-NAME+indometacina (INDO) (D, E, F). Valores apresentados em média $\pm$ E.P.M. de 6-8 preparações independentes