

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

Patrícia de Souza Rossignoli

**EFEITOS DA ORQUIDECTOMIA, SEGUIDA OU NÃO DE REPOSIÇÃO COM
TESTOSTERONA, SOBRE AS RESPOSTAS VASOMOTORAS DE VEIAS DE
RATOS À ESTIMULAÇÃO DE RECEPTORES ADRENÉRGICOS**

Botucatu/SP

2012

Patrícia de Souza Rossignoli

EFEITO DA ORQUIDECTOMIA, SEGUIDA OU NÃO DE REPOSIÇÃO COM TESTOSTERONA, SOBRE AS RESPOSTAS VASOMOTORAS DE VEIAS DE RATO À ESTIMULAÇÃO DE RECEPTORES ADRENÉRGICOS

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

Orientador: Prof. Dr. Agnaldo Bruno Chies

Co-Orientador: Prof. Dr. Oduvaldo Câmara Marques Pereira

Botucatu/SP

2012

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

Rossignoli, Patrícia de Souza.

Efeitos da orquidectomia, seguida ou não de reposição com testosterona, sobre as respostas vasomotoras de veias de rato à estimulação de receptores adrenérgicos / Patrícia de Souza Rossignoli. – Botucatu : [s.n.], 2012

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Agnaldo Bruno Chies

Co-orientador: Oduvaldo Câmara Marques Pereira

Capes: 21000000

1. Testículos – Cirurgia. 2. Testosterona. 3. Receptores hormonais. 4. Hormônios.

Palavras chave: Orquidectomia; Simpatomiméticos; Testosterona; Veia; Venoespasm.

Dedicatória

Às pessoas que sempre estiveram comigo pelo simples fato de acreditarem em mim...

À minha mãe Cidinha, por ter sido meu maior exemplo de perseverança, me ensinando que os obstáculos impostos pela vida são muitos, cabendo exclusivamente a nós a decisão de enfrentá-los e, mas que isso, de vencê-los.

Ao meu pai Reinaldo, que talvez mesmo sem saber, foi aquele que me encorajou a iniciar minha vida acadêmica, pois sempre acreditou que este era meu sonho, e que sonhos devem ser realizados.

À minha irmã Jaqueline, por ter sido uma amiga com quem pude contar em todos os momentos, e que sempre tentou com seu jeitinho, mesmo que algumas vezes sem sucesso, me alegrar e me ensinar que a vida pode ser mais leve do que imaginamos;

Ao meu maior presente, ao meu marido Marcus, por tornar cada momento e cada conquista muito mais especiais, por me oferecer seu amor, seu abraço e seu sorriso a todo o tempo, independentemente do meu merecimento, por simplesmente existir em minha vida, tornando-a um lugar muito melhor de se viver.

***Agradecimentos
Especiais***

Ao Orientador, Prof. Agnaldo

Por ter me aproximado da pesquisa científica desde minha graduação, me encorajando ao ingresso na Pós-Graduação. A você serei eternamente grata por esta oportunidade, por ter despertado em mim o interesse pela ciência e por ter acreditado no meu potencial, me dando toda a orientação necessária para o desenvolvimento do meu trabalho.

Ao Co-Orientador, Prof. Oduvaldo

Por ter aberto as portas de seu laboratório a mim e ao Prof. Agnaldo, por ter acreditado em nossa proposta, bem como pela sua disponibilidade em acompanhar a execução do trabalho, nos dando todo o apoio necessário à realização do mesmo.

Agradecimientos

À FAPESP, pelo auxílio financeiro em forma de bolsa de Doutorado (processo nº 09/08012-2) para o desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES, pelo auxílio financeiro em forma de bolsa de Doutorado para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da FAMEMA, Alisson e Paulo, pelo auxílio na execução dos experimentos, bem como na manutenção dos 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 professores de Farmacologia da FAMEMA, Prof. Dr. Carlos Alberto Lazarini e Prof. Dr. Osni Lázaro Pinheiro, que sempre estiveram dispostos a me ajudar.

Ao Prof. Dr. Spencer Payão por ter me dado permissão para a utilização do Laboratório de Biologia Molecular da FAMEMA, e ao técnico Roger, pelo auxílio nos experimentos que envolveram a Biologia Molecular.

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, Luciana, Davi, André 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.

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

À minha grande amiga de laboratório Rafaela, por quem desenvolvi uma grande admiração e amizade, uma pessoa que me ajudou, e muito, na etapa final do meu Doutorado, para quem eu só posso agradecer pelo companheirismo e dedicação que sempre teve por mim. Pessoa íntegra, correta, honesta, características raras hoje em dia.

À Daniela e ao Luiz, alunos de Iniciação Científica da FAMEMA, que sempre estiveram dispostos a me ajudar, e que tornaram meus dias de experimento mais divertidos.

Aos grandes amigos de Botucatu: Renata e Daniel, Michele, Juliana, Fernanda e Vanessa, que sempre me ajudaram em tudo que precisei, me oferecendo desde moradia até o ombro amigo, que se mostraram pessoas maravilhosas, com as quais tive o prazer de conviver. Podem ter certeza de que vocês tornaram as minhas viagens para Botucatu muito mais divertidas, apesar da chuva e do frio!

Aos amigos-irmãos de sempre Cristiane, Anderson, Daniela, Mariana, Roberta, Harada, Montanha, Gabriel e Seme 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

As repercussões fisiológicas da redução a longo prazo dos níveis plasmáticos de testosterona têm sido sistematicamente estudadas, uma vez que retratam algumas situações clínicas comumente observadas em homens, tais como o hipogonadismo e o envelhecimento. Um dos importantes alvos das ações androgênicas é o sistema cardiovascular. Particularmente, existe uma importante lacuna de conhecimento em relação à ação da testosterona em leitos venosos. Observamos anteriormente que a orquidectomia promove aumento das ações vasomotoras da fenilefrina em veia porta de rato e que mecanismos relacionados à endotelina-1 poderiam estar envolvidos neste fenômeno. Assim, o objetivo do presente trabalho foi estudar a influência da orquidectomia, seguida ou não de reposição hormonal com testosterona, sobre as respostas vasomotoras de diferentes 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). Destes animais, anéis (4–5 mm) de veias pulmonar, renal, femoral, mesentérica, assim como de artérias, pulmonar, femoral, mesentérica, aorta torácica e abdominal foram estudados em cubas de órgão isolado. Obtiveram-se curvas concentração-resposta para fenilefrina, noradrenalina, clonidina, metoxamina, assim como para endotelina-1, calculando-se pEC_{50} e resposta máxima (R_{max}). Além disso, determinou-se a expressão do mRNA para endotelina-1 e para os receptores ET_A e ET_B . Os resultados mostraram que a orquidectomia seguida ou não de reposição hormonal não alterou a capacidade contrátil de veia porta frente à clonidina e metoxamina, tampouco frente à noradrenalina na presença de timolol ($10^{-6}M$) ou timolol ($10^{-6}M$) + ioimbina ($10^{-6}M$). No entanto, muito embora a orquidectomia não tenha promovido modificações de reatividade de veia porta frente à endotelina-1, observou-se aumento na expressão gênica de endotelina-1 e receptores ET_B em veia porta de animais orquidectomizados. A orquidectomia, seguida ou não de terapia de reposição hormonal com testosterona, não modificou significativamente a resposta de veias pulmonar, renal, femoral e mesentérica, assim como de artérias pulmonar, mesentérica e aorta torácica frente aos agonistas estudados. Contudo, a orquidectomia aumentou a reatividade de artéria femoral à fenilefrina. Por outro lado, o tratamento hormonal de animais orquidectomizados aumentou a reatividade de aorta abdominal à fenilefrina e noradrenalina. Concluindo, as modificações de resposta aos agonistas simpatomiméticos induzidas pela orquidectomia em veia porta são agonista-específicas e parecem não envolver modificações de receptores α_2 e β -adrenérgicos, bem como mecanismos de captação neuronal de catecolaminas. Além disso, o aumento na expressão de endotelina-1 induzido pela orquidectomia pode estar relacionado ao já observado aumento das respostas deste leito venoso à fenilefrina. O fato da orquidectomia não alterar o padrão de reatividade de veias pulmonar, renal, femoral e mesentérica frente aos agonistas estudados sugere ainda que o aumento das respostas de veia porta à fenilefrina trata-se de um fenômeno território-específico. O aumento de R_{max} induzido pela orquidectomia observado em artéria femoral à fenilefrina provavelmente envolve mecanismos não dependentes de testosterona, sendo ainda possível que os níveis supra-fisiológicos de testosterona alcançados com a reposição tenham promovido aumento da resposta da aorta abdominal tanto à fenilefrina quanto à noradrenalina.

Palavras chave: Orquidectomia; Simpatomiméticos; Testosterona; Veia; Venoespasm.

Abstract

The physiological repercussions of a long term reduction in testosterone levels have been systematically investigated, once it can be related with some clinical situations frequently seen in men such as hypogonadism and aging. One of the most important targets of androgen actions is the cardiovascular system. However, androgenic actions upon this system remain controversial especially in venous bed. We have previously observed that orchidectomy induces an increase in vasomotor responses of phenylephrine in rat portal vein. Probably mechanisms related to endothelin-1 could be involved in this phenomenon. Thus, the presented study aimed to investigate the influence of orchidectomy, followed or not by testosterone replacement, upon the response of different isolated veins to sympathomimetic agonists. 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). Rings (3-4 mm) of pulmonary, renal, femoral and mesenteric veins and pulmonary, femoral and mesenteric arteries, as well as thoracic and abdominal aorta were studied in organ baths. Concentration-response curves were obtained to phenylephrine, norepinephrine, clonidine, methoxamine, and to endothelin-1. The maximum response (R_{max}) and EC_{50} were calculated. Furthermore, we determined the mRNA expression of endothelin-1 and the ET_A and ET_B receptors. The results showed that orchidectomy, followed or not by testosterone replacement did not alter the contractile response of portal vein to clonidine and methoxamine, either face to noradrenaline in the presence of timolol ($10^{-6}M$) or timolol ($10^{-6}M$) + yohimbine ($10^{-6}M$). However, although modifications of portal vein responses to endothelin-1 were not induced by orchidectomy, there was an increase in gene expression of endothelin-1 and ET_B receptors in the portal vein of orchidectomized animals. The orchidectomy, followed or not by testosterone replacement did not modify significantly the response of pulmonary, renal, femoral and mesenteric veins and pulmonary and mesenteric arteries, as well as thoracic aorta, to the agonists studied. However, orchidectomy increased reactivity of femoral artery to phenylephrine. Moreover, testosterone replacement increased reactivity of abdominal aorta to phenylephrine and noradrenaline. In conclusion, the orchidectomy-induced changes in response to sympathomimetic in portal vein are agonist-specific and do not seem to involve modifications of α_2 and β -adrenergic receptors and mechanisms related to neuronal uptake of catecholamines. Furthermore, the orchidectomy-induced increase in the expression of endothelin-1 may be related to the increase in portal vein responses to phenylephrine that was previously observed. The fact that orchidectomy did not alter the reactivity of pulmonary, renal, femoral and mesenteric vein to the agonists studied suggests that changes in response to phenylephrine induced by orchidectomy in portal vein appear to be territory-specific. The orchidectomy-induced increase in R_{max} observed of femoral artery to phenylephrine probably involves mechanisms that are not dependent of testosterone, and it is possible that the supraphysiological testosterone levels obtained with the replacement protocol have promoted an increase in response of abdominal aorta to phenylephrine and noradrenaline.

Keywords: Orchidectomy; Sympathomimetics; Testosterone; Vein; Venoconstriction.

Sumário

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 11 |
| 1.1 Ações da testosterona no leito arterial..... | 11 |
| 1.2 Ações da testosterona no leito venoso | 16 |
| 2 OBJETIVOS | 20 |
| 2.1 Geral | 20 |
| 2.2 Específicos | 20 |
| 2.3 Complementares..... | 21 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 22 |
| 3.1 Animais | 22 |
| 3.2 Grupos experimentais | 22 |
| 3.3 Protocolo de orquidectomia | 22 |
| 3.4 Protocolo de reposição hormonal com testosterona | 23 |
| 3.5 Dosagem de testosterona plasmática..... | 24 |
| 3.6 Pesagens..... | 24 |
| 3.7 Isolamento e montagem das preparações de leitros venosos e arteriais para estudo funcional de reatividade vascular | 25 |
| 3.8 Curvas concentração-resposta | 26 |
| 3.9 Investigação da influência dos receptores β ou α_2 -adrenérgicos frente às alterações de resposta vasomotora induzidas pela orquidectomia | 26 |
| 3.10 Investigação funcional da participação de produtos derivados da NOS e COX na modulação do tônus venoso e arterial..... | 26 |
| 3.11 Análise de parâmetros farmacológicos | 26 |
| 3.12 Expressão do mRNA para endotelina-1 e para os receptores ET_A e ET_B de endotelina-1 | 27 |
| 3.12.1 Extração do RNA..... | 27 |
| 3.12.2 Síntese de cDNA..... | 28 |
| 3.12.3 PCR Quantitativo em Tempo Real (RQ-PCR)..... | 28 |
| 3.13 Análise estatística | 30 |
| 3.14 Diagrama experimental | 31 |
| 3.15 Drogas e reagentes | 32 |
| 4. RESULTADOS | 33 |
| 4.1 Repercussões não-vasculares da orquidectomia, seguida ou não pela reposição hormonal com testosterona | 33 |
| 4.1.1 Dosagem de testosterona plasmática | 33 |

| | | |
|---------|--|----|
| 4.1.2 | Pesagens | 33 |
| 4.1.2.1 | Pesagens dos animais..... | 33 |
| 4.1.2.2 | Pesagem dos órgãos sexuais acessórios hormônio- dependentes e glândulas adrenais | 34 |
| 4.2 | Repercussões vasculares da orquidectomia, seguida ou não pela reposição hormonal com testosterona | 36 |
| 4.2.1 | Estudo das respostas vasomotoras de preparações de veia porta à clonidina e à metoxamina | 36 |
| 4.2.2 | Estudo das respostas vasomotoras de preparações de veia porta à noradrenalina na vigência do bloqueio dos receptores β ou α_2 -adrenérgicos..... | 37 |
| 4.2.3 | Estudo dos mecanismos relacionados à endotelina-1 em preparações de veia porta obtidas de animais orquidectomizados, submetidos ou não à reposição hormonal com testosterona | 39 |
| 4.2.3.1 | Estudo funcional das respostas vasomotoras de veia porta à endotelina-1 | 39 |
| 4.2.3.2 | Estudo da expressão de mRNA para endotelina-1 e para os receptores ET_A E ET_B de endotelina-1 em veia porta isolada de rato | 40 |
| 4.2.4 | Estudo das respostas vasomotoras de preparações de veias pulmonar, renal, femoral e mesentérica obtidas de animais orquidectomizados, submetidos ou não à reposição de testosterona, à fenilefrina, noradrenalina, clonidina e metoxamina..... | 41 |
| 4.2.4.1 | Veia pulmonar..... | 41 |
| 4.2.4.2 | Veia renal..... | 43 |
| 4.2.4.3 | Veia femoral..... | 44 |
| 4.2.4.4 | Veia mesentérica | 46 |
| 4.2.5 | Estudo das respostas vasomotoras de preparações de artérias pulmonar, femoral, mesentérica, aorta torácica e aorta abdominal à fenilefrina e à noradrenalina | 47 |
| 4.2.5.1 | Artéria pulmonar | 47 |
| 4.2.5.2 | Artéria femoral | 48 |
| 4.2.5.3 | Artéria mesentérica..... | 49 |

| | |
|--|----|
| 4.2.5.4 Aorta torácica..... | 50 |
| 4.2.5.5 Aorta abdominal..... | 51 |
| 5 DISCUSSÃO | 53 |
| 5.1 Repercussões não-vasculares da orquidectomia, seguida ou não pela reposição hormonal com testosterona | 53 |
| 5.2 Repercussões vasculares da orquidectomia, seguida ou não pela reposição hormonal com testosterona | 55 |
| 6 CONCLUSÕES | 64 |
| 7 REFERÊNCIAS | 65 |
| 8 ANEXO | 79 |

Introdução

1.1. Ações da testosterona no leito arterial

As repercussões fisiológicas da redução a longo prazo dos níveis plasmáticos de testosterona têm sido sistematicamente estudadas, uma vez que esta queda dos níveis hormonais está envolvida em algumas situações clínicas comumente observadas em homens. O hipogonadismo, por exemplo, é uma situação clínica na qual a produção de testosterona e conseqüentemente a sua função fisiológica estão prejudicadas (ZITZMANN et al., 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 supressão natural da função do eixo hipotalâmico-hipofisário (VERMEULEN et al., 1972; BAUM & CRESPI, 2007; SEIDMAN, 2007).

Um dos importantes alvos das ações androgênicas é o sistema cardiovascular (FARHAT et al., 1995; WANG et al., 2002; McKEE et al., 2003; BERNINI et al., 2006). De fato, 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. Além disso, sugere-se que a testosterona esteja envolvida na patogênese da aterosclerose e, por conseqüência, das doenças coronarianas (NETTLESHIP et al., 2009).

Em contrapartida, outros estudos têm demonstrado um efeito protetor da testosterona sobre o sistema cardiovascular. Isto porque baixos níveis plasmáticos de testosterona, contrariamente ao que foi relatado anteriormente, podem estar associados com disfunção endotelial (AKISHITA et al., 2007). Além disso, em pacientes portadores de câncer de próstata submetidos à terapias de privação androgênica tem sido observado aumento no risco de desenvolvimento de síndrome metabólica, diabetes mellitus e doença arterial coronariana (KAPOOR et al., 2008; KINTZEL et al., 2008).

A testosterona pode agir diretamente sobre o sistema cardiovascular através de mecanismos não-genômicos, independentes dos receptores intracelulares de

androgênio (JONES et al., 2003). Esta ação da testosterona parece ser mediada por receptores de androgênio localizados na membrana plasmática de células da musculatura lisa vascular e endotélio (HONDA et al., 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 et al., 2000; TEP-AREENAN et al., 2002). Os efeitos não-genômicos da testosterona sobre o sistema cardiovascular caracterizam-se por serem desencadeados agudamente (SIMONCINI & GENAZZANI, 2003).

A testosterona, além das ações não-genômicas mencionadas, pode modular a reatividade vascular através dos mecanismos classicamente descritos como genômicos. Entende-se por mecanismos genômicos a atuação da testosterona através da ligação e ativação de receptores de androgênio intracelulares localizados no citoplasma tanto de células endoteliais quanto da musculatura lisa vascular. Uma vez ativado, o complexo hormônio-receptor se transloca para o núcleo onde regula a transcrição do DNA (McGILL & HERIDAN, 1981; HORWITZ & HORWITZ, 1982; LIN et al., 1985; TRAISH et al., 1986; STUMPF, 1990; FUJIMOTO et al., 1994; HIGASHIURA et al., 1997; WU & ECKARDSTEIN, 2003; ORSHAL & KHALIL, 2004). Uma das características dos efeitos genômicos da testosterona é que estes acontecem a longo prazo.

O emprego de animais orquidectomizados tem sido muito difundido uma vez que simula, ao menos parcialmente, as condições clínicas caracterizadas por reduções dos níveis plasmáticos de testosterona. Estudos realizados em artérias isoladas relatam diferentes alterações de resposta vasomotoras induzidas pela orquidectomia, dependendo do leito vascular estudado bem como do agonista empregado. A orquidectomia aumentou a resposta do corpo cavernoso de rato à fenilefrina (MILLS et al., 1992; REILLY et al., 1997), bem como de aorta torácica de rato à noradrenalina (WANG et al., 2002). Em aorta isolada de rato, porém, a orquidectomia foi responsável por diminuir a vasoconstrição frente à clonidina (TEJERA et al., 1999). Além disso, a orquidectomia não modificou significativamente as respostas vasomotoras de aortas isoladas de rato à noradrenalina (MATSUDA et al., 1994). Dessa forma, através do emprego da orquidectomia é possível ampliar o conhecimento a cerca das repercussões vasculares da redução crônica dos níveis

plasmáticos de testosterona.

Contudo, estudos mais abrangentes objetivam não só reconhecer os efeitos das orquidectomia sobre o sistema cardiovascular. Protocolos de reposição hormonal com testosterona têm sido amplamente utilizados, e dessa maneira é possível avaliar a efetividade da reposição hormonal em reestabelecer possíveis alterações vasculares induzidas pela orquidectomia. Com isto, os resultados obtidos adquirem uma importância ainda maior, pois além de servirem de contraprova dos efeitos da redução de testosterona pela orquidectomia, servem de base para estudos em humanos que avaliam os benefícios da reposição hormonal no hipogonadismo e envelhecimento do homem, por exemplo (BHASIN et al., 2006).

A terapia de reposição hormonal com testosterona foi responsável por aumentar a resposta vasoconstritora de artérias de resistência de homens com hipogonadismo frente à noradrenalina (MALKIN et al., 2006). Além disso, verificou-se que o tratamento com testosterona promoveu redução da vasodilatação endotélio-dependente em homens adultos com hipogonadismo (SADER et al., 2003; BERNINI et al., 2006). Contudo, a terapia de reposição hormonal com testosterona tem sido associada a uma redução na mortalidade de homens que apresentam baixos níveis deste hormônio (MOLLY et al., 2012).

Em animais tem sido observado que a reposição por um mês com testosterona restabeleceu o tônus vascular de pequenas artérias cerebrais de resistência de ratos, diminuído pela orquidectomia (GEARY et al., 2000; GONZALES et al., 2004; GONZALES et al., 2005). 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 tromboxano (TXA₂) (SCHROR et al., 1994). A testosterona também foi responsável por potencializar a constrição de artérias coronárias de porcos de ambos os sexos, induzida por cloreto de potássio (FARHAT et al., 1995). Por outro lado, tem sido observado que a reposição hormonal com testosterona é capaz de reverter o aumento de resposta de aorta torácica de rato à noradrenalina induzido pela orquidectomia (WANG et al., 2002).

Por sua vez, em estudos in vivo, o tratamento com testosterona potencializou a resposta pressórica induzida pela noradrenalina em gatos (BHARGAVA, et al., 1967) e ratos (BAKER et al., 1978), assim como no trem-posterior perfundido de

cachorros (GREENBERG et al., 1974). Além disso, a orquidectomia reduziu a pressão arterial média em ratos com hipertensão induzida por consumo de dieta rica em sal, sendo a reposição hormonal com testosterona capaz de reverter tal fenômeno, o que indica uma participação deletéria da testosterona no desenvolvimento e manutenção da hipertensão (OLOYO et al., 2011).

Diversos mecanismos podem estar envolvidos nas ações moduladoras da testosterona sobre as respostas dos vasos sanguíneos aos agonistas farmacológicos anteriormente mencionados. A atuação da testosterona através de mecanismos genômicos pode levar a indução ou repressão de genes específicos, 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; GEARY et al., 2000; McKEE et al., 2003; GONZALES et al., 2004; GONZALES et al., 2005).

De fato, sugere-se que a expressão gênica da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), enzima produtora de óxido nítrico (NO), no tecido peniano de ratos é reduzida com a orquidectomia (REILLY et al., 1997). Em contrapartida, a expressão da NOS endotelial (eNOS) no tecido peniano de ratos é aumentada na situação de privação de testosterona (SHEN et al., 2000). Já a suplementação com testosterona foi responsável por elevar discretamente a expressão da NOS induzível (iNOS) em células germinativas e células de Sertoli dos testículos de macacos (GUO et al., 2009). Contudo, o restabelecimento do tônus vascular de pequenas artérias cerebrais de resistência de ratos através da reposição hormonal com testosterona, diminuído pela orquidectomia, parece não depender de mecanismos relacionados ao NO (GEARY et al., 2000).

A orquidectomia também promoveu uma redução da expressão gênica de ciclooxigenase (COX), enzima produtora de prostanóides, no epidídimo de ratos (CHEUK et al., 2000). Contudo, em aorta isolada de animais orquidectomizados, a expressão da COX-2 mostrou-se aumentada (MARTORELL et al., 2008). Além disso, a testosterona reforçou a participação de prostanóides contraturantes na resposta de artérias mesentéricas de resistência de ratos à fenilefrina (McKEE et al., 2003). Relatou-se também um aumento na expressão da tromboxano A₂ sintase

(TXA₂ sintase), com conseqüente aumento da produção local de TXA₂, capaz de restabelecer o tônus vascular de pequenas artérias cerebrais de resistência de ratos, diminuído pela orquidectomia (GONZALES et al., 2005). Sugere-se ainda que a supressão de mecanismos hiperpolarizantes possa estar envolvida neste reestabelecimento de tônus destas artérias cerebrais de ratos orquidectomizados (GONZALES et al., 2004). Fenômeno semelhante foi observado em aorta de ratos, nas quais a orquidectomia foi responsável por reduzir drasticamente a função dos canais de potássio voltagem-dependentes, função esta reestabelecida através da reposição hormonal com testosterona (ZHOU et al., 2008). Em contrapartida, tem sido relatado que a privação hormonal de testosterona aumenta a liberação não-endotelial de TXA₂ em artéria mesentérica de ratos, aumento este contrabalanceado por mecanismos relacionados à PGI₂ (CAMPO et al., 2008).

Em leitos arteriais de ratos, a testosterona também influencia a produção endotelial de endotelina-1, um peptídeo vasoconstritor envolvido na modulação do tônus vascular (TAKAHASHI et al., 2002; TAKAHASHI et al., 2003; PEARSON et al., 2008). Neste contexto, aumentos nos níveis circulantes de endotelina-1 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-1 circulante em homens adultos (POLDERMAN et al., 1993). Por outro lado, tem sido relatado que em homens com hipogonadismo os níveis plasmáticos de endotelina-1 estão aumentados, e uma tendência à redução desses níveis é observada após terapia de reposição hormonal com testosterona (KUMANOV et al., 2007). 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 et al., 2005).

Portanto, diante da revisão de literatura apresentada, pode-se observar que o conhecimento das ações da testosterona sobre a reatividade arterial ainda é bastante controverso e escasso.

1.2. Ações da testosterona no leito venoso

O leito venoso exerce papel central 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 et al., 1970). Constatou-se, por meio de uma cuidadosa revisão da literatura, que informações sobre os efeitos da testosterona em leitos venosos são escassas. Esta carência de informações merece especial atenção em vista da importância hemodinâmica deste leito para a fisiologia cardiovascular.

Uma vez que a complacência venosa pode ser alterada em consequência da estimulação simpática (DONEGAN, 1921; FURNESS & MARSHALL, 1974; ROTHER, 1983; SUTTER, 1990; ROWELL, 1993) é importante considerar o impacto de modificações nos níveis séricos da testosterona sobre a resposta das veias às catecolaminas. A participação simpática é determinante, sobretudo nas modificações rápidas do retorno venoso como, por exemplo, nas modificações posturais e durante o exercício (ROWELL, 1993). Ainda em relação ao exercício, ocorre um importante aumento da demanda metabólica nesta condição, sobretudo na musculatura cardíaca e na musculatura esquelética em atividade (DELP & O'LEARY, 2004; DUNCKER & BACHE, 2008). Com isso, o fluxo sanguíneo para os diversos territórios vasculares é extensamente redistribuído, com aumento de fluxo para coração, diafragma e musculatura esquelética envolvida na locomoção à custa de uma diminuição para pele, estômago, intestinos, pâncreas, fígado, rins, baço e musculatura esquelética em repouso (MUSCH et al., 1987a; MUSCH et al., 1987b). Com efeito, sugere-se que a importância da venoconstrição ativa no retorno venoso, e conseqüentemente no aumento do débito cardíaco nas situações que envolvem redistribuição do fluxo sanguíneo acima mencionadas, está estreitamente relacionada com o papel fisiológico distinto desempenhado pelos diferentes leitos venosos (ROWELL, 1993; SHERIFF et al., 1993; KJEKSHUS et al., 2000; HAINSWORTH & DRINKHILL, 2006; ROTHER, 2006).

Visando uma compreensão mais ampla sobre as repercussões fisiológicas da

privação e/ou reposição hormonal com testosterona no sistema cardiovascular, o trabalho de mestrado objetivava estudar a influência da orquidectomia e da reposição de testosterona sobre as respostas vasomotoras de veias isoladas de rato a agonistas simpatomiméticos. Neste estudo, investigou-se ainda a participação de mecanismos endoteliais e/ou sub-endoteliais, relacionados ao NO, aos prostanóides e à endotelina-1, nas modificações das respostas vasomotoras aos agonistas simpatomiméticos induzidas pela orquidectomia.

Os principais resultados obtidos neste estudo demonstraram que a redução drástica dos níveis circulantes de testosterona induzida pela orquidectomia promove aumento das ações vasomotoras da fenilefrina em veia porta, mas não em veia cava isolada de rato. O fato de que as alterações de resposta máxima ocorreram somente em veia porta isolada de rato sugere que o impacto da orquidectomia sobre a reatividade vascular de leitos venosos é território-específico (ROSSIGNOLI et al., 2010). Na ocasião, observamos que as modificações na resposta vasomotora de veia porta isolada de rato ocorrem frente à fenilefrina, mas não frente à noradrenalina, sugerindo um fenômeno agonista-específico. Observamos também que a participação de NO ou prostanóides nas modificações de resposta à fenilefrina, induzidas pela orquidectomia em veia porta de rato, parece não ser significativa. Por outro lado, as modificações induzidas pela orquidectomia parecem depender da ativação tanto de receptores ET_A quanto de receptores ET_B de endotelina-1, pois esta não ocorre na vigência do bloqueio destes receptores. Com base nestas observações, é possível supor que as modificações de resposta da veia porta à fenilefrina impostas pela orquidectomia envolvem a participação da endotelina-1 produzida localmente, através dos receptores ET_A e ET_B .

Diante do exposto, entendemos que uma compreensão mais ampla dos efeitos das modificações dos níveis séricos de testosterona sobre as veias requer mais estudos, inclusive abordando outros leitos venosos além da veia porta e da veia cava. Por conta disto, no presente estudo, investigamos a influência da orquidectomia seguida ou não pela reposição com testosterona nas veias pulmonares, renais e femorais.

A veia pulmonar é um leito venoso que compõe a pequena circulação, onde o fluxo sanguíneo é aumentado na redistribuição circulatória (FLAMM et al., 1990). A veia renal também é um leito vascular no qual a vasoconstrição ativa tem grande

importância nas situações de redistribuição de fluxo. Porém, diferentemente da região pulmonar, nos rins ocorre redução do fluxo sanguíneo em situações que envolvem maciça ativação do sistema nervoso simpático (KOÇER et al., 2011). O mesmo ocorre no território esplâncnico, onde a vasoconstrição ativa é importante para a mobilização do conteúdo sanguíneo contido nesta região (HAINSWORTH & DRINKHILL, 2006; ROTHE, 2006). Embora a veia porta seja a principal responsável pelo escoamento do volume sanguíneo proveniente da região esplâncnica, a veia mesentérica também realiza uma participação significativa neste processo (HAMZA & KAUFMAN, 2011). Já a veia femoral é responsável pela drenagem do sangue proveniente dos membros posteriores, caracterizados pela grande massa muscular, desempenhando um papel fisiológico distinto do papel da veia cava. Cabe ressaltar que esta musculatura é essencial ao exercício e à reação de luta ou fuga e, como consequência, o fluxo sanguíneo através da veia femoral aumenta muito nestas situações (SHERIFF et al. 2005).

Para averiguar se eventuais modificações de resposta destes leitos venosos são agonista-específicas, no presente estudo propusemo-nos a investigar as respostas dos leitos venosos a agonistas simpatomiméticos com seletividades por diferentes receptores adrenérgicos. É sabido que a noradrenalina é um neurotransmissor endógeno do sistema nervoso simpático que atua não-seletivamente através de adrenoceptores α e β (KAISER et al., 1964; MÜLLER-RUCHHOLTZ et al., 1977a,b; HAYASHI & TODA, 1978). Já a fenilefrina e a metoxamina são agonistas sintéticos com seletividade conhecida para adrenoceptores α_1 , receptores estes estreitamente relacionados com a contração de leitos vasculares (DIGGES & SUMMERS, 1983; SUDHIR et al., 1990). A clonidina, por sua vez, também é reconhecida como um agente contraturante de leitos vasculares, porém com seletividade para adrenoceptores α_2 (ITO & CHIBA, 1987).

Por fim, muito embora não tenha sido evidenciada a participação de mecanismos relacionados ao NO e prostanóides no aumento de reatividade de veia porta isolada de rato, induzida pela orquidectomia, frente à fenilefrina, não é possível descartar a participação destes mecanismos locais no controle do tônus vascular de outros leitos venosos que não a veia porta, uma vez que tem sido relatada que a ação da noradrenalina em leitos venosos 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). Além disso, esclarecimentos a cerca da participação da endotelina-1 no aumento de reatividade frente à fenilefrina em veia porta isolada de ratos orquidectomizados são necessários. Contudo, não é possível descartar a participação da endotelina-1 no controle do tônus vascular de outras veias, pois tem sido demonstrado o envolvimento deste peptídeo na resposta vasoconstritora de leitos venosos (KEEN et al., 2008; MILDENBERGER et al., 2008; UDYAVAR et al., 2008; MANSART et al., 2010).

Objetivos

2.1. Geral

Estudar a influência da orquidectomia, seguida ou não de reposição hormonal com testosterona, sobre as respostas vasomotoras de diferentes veias isoladas de rato a agonistas simpatomiméticos.

2.2. Específicos

2.2.1. Verificar se a orquidectomia, seguida ou não de reposição hormonal com testosterona, modifica as respostas vasomotoras de veia porta frente à clonidina e metoxamina;

2.2.2. Investigar a influência dos adrenoceptores β ou α_2 frente às alterações de resposta vasomotora induzidas pela orquidectomia em veia porta isolada de rato à fenilefrina, mas não à noradrenalina;

2.2.3. Investigar a participação da endotelina-1 no aumento de resposta de veia porta à fenilefrina, induzido pela orquidectomia;

2.2.4. Verificar se a orquidectomia, seguida ou não de reposição hormonal com testosterona, modifica as respostas vasomotoras de veias pulmonar, renal, femoral e mesentérica isoladas de rato, frente aos agonistas simpatomiméticos: fenilefrina, noradrenalina, clonidina e metoxamina;

2.2.5. Investigar a participação de mecanismos relacionados ao NO, aos prostanóides e à endotelina-1 nas modificações de resposta vasomotora que porventura venham a ser detectadas em alguma das diferentes preparações estudadas, em consequência da orquidectomia e/ou reposição hormonal com testosterona.

2.3. Complementares

Ampliar o estudo acerca da influência da orquidectomia, seguida ou não de reposição hormonal com testosterona, sobre as respostas vasomotoras das artérias pulmonar, femoral, mesentérica, aorta torácica e abdominal aos agonistas simpatomiméticos: fenilefrina e noradrenalina.

*Material e
Métodos*

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. 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 268/09.

3.2. Grupos experimentais

Os 180 animais utilizados foram divididos em três grupos: controles (falso-operados) (60 animais), orquidectomizados (60 animais) e orquidectomizados com subsequente reposição hormonal com testosterona (60 animais).

3.3. Protocolo de orquidectomia

Os animais foram orquidectomizados ao completar 90 dias de idade, pois os níveis plasmáticos de testosterona estabilizam-se por volta desta idade (WHITE et al., 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 pedículo vascular foi ligado e o testículo foi então extirpado. O mesmo processo foi repetido para a remoção do testículo contralateral. Extirpados os testículos, 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 10.000.000 UI, 5ml/kg, i.m. (GONZALES et al., 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 úmido 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 androgênios.

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

A reposição hormonal com testosterona havia sido padronizada em trabalho anterior (ROSSIGNOLI et al., 2010) tendo como base 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 foi iniciado no 23^o dia após a orquidectomia, uma vez que a literatura sugere a estabilização da atrofia dos órgãos sexuais acessórios hormônio-dependentes por volta do 20^o 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) e orquidectomizados 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.

3.5. Dosagem de testosterona plasmática

Amostras de sangue foram coletadas com seringas contendo heparina através de punção de veia cava realizada com os animais anestesiados, imediatamente antes do sacrifício dos mesmos. Posteriormente, tais amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 20 min 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*.

3.6. 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 constatada. 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, próstata, ductos deferentes e epidídimos), 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).

3.7. Isolamento e montagem das preparações de leitos venosos e arteriais 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, pulmonar (porção extra-lobular proximal esquerda segundo Bronquard et al., 2007), renal esquerda, femoral esquerda e veia mesentérica superior, assim como os leitos das artérias pulmonar esquerda, femoral esquerda, mesentérica superior, aorta torácica e aorta abdominal 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 lúmem). 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 tónus 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, exceto a aorta torácica e aorta abdominal, para as quais a tensão utilizada foi de 1,0g, visando a estabilização das mesmas. Neste período, bem como durante todo o experimento, a solução nutritiva foi substituída a cada 15 minutos.

3.8. Curvas concentração-resposta

A reatividade vascular foi estudada através da obtenção de curvas concentração-resposta cumulativas para fenilefrina ($10^{-10}\text{M} - 10^{-4}\text{M}$), noradrenalina ($10^{-10}\text{M} - 10^{-4}\text{M}$), clonidina ($10^{-10}\text{M} - 10^{-4}\text{M}$) e metoxamina ($10^{-10}\text{M} - 10^{-4}\text{M}$). Além disso, o estudo de reatividade vascular também foi realizado em algumas preparações através da obtenção de curvas concentração-resposta cumulativas para endotelina-1 ($10^{-10}\text{M} - 10^{-5}\text{M}$).

3.9. Investigação da influência dos receptores β ou α_2 -adrenérgicos frente às alterações de resposta vasomotora induzidas pela orquidectomia

Algumas preparações foram previamente incubadas com timolol (10^{-6}M) ou ioimbina (10^{-6}M) para posterior desafio com noradrenalina. Os inibidores foram administrados diretamente ao banho 20 minutos antes do início das curvas concentração-resposta.

3.10. Investigação funcional da participação de produtos derivados da NOS e COX na modulação do tônus venoso e arterial

Algumas preparações foram estudadas na presença de L-NAME 10^{-4}M e L-NAME 10^{-4}M + indometacina (INDO) 10^{-5}M . Os inibidores foram administrados diretamente ao banho 20 minutos antes do início das curvas concentração-resposta.

3.11. Análise de parâmetros farmacológicos

A partir das curvas concentração-resposta obtidas foram calculados os valores de pEC_{50} , 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.). Os valores de resposta contrátil máxima (R_{max}), em gramas, das

preparações frente aos agentes estudados também foram determinados.

3.12. Expressão do mRNA para endotelina-1 e para os receptores ET_A e ET_B de endotelina-1

A expressão de mRNA para endotelina-1 e para os receptores ET_A e ET_B de endotelina-1 foi detectada por PCR Quantitativo em Tempo Real (RQ-PCR) conforme protocolo descrito na literatura (DAVID et al., 2002; TIRAPELLI et al., 2005). As amostras foram mantidas congeladas até que o RNA fosse extraído e mensurado pela técnica de RQ-PCR de acordo com protocolos descritos a seguir:

3.12.1. Extração do RNA

Às amostras foram adicionados 250µl de PBS (phosphate-buffered saline) e 750µl de Trizol[®] (Invitrogen, EUA). O fragmento de tecido foi homogeneizado com a utilização de um aparelho Politron[®]. Após permanência em temperatura ambiente por 5 minutos, foi acrescentado 200µl de clorofórmio, agitando-se vigorosamente por 15 segundos. A solução final foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 13.200 rpm e a fase aquosa (superior) de cada frasco foi transferida para novos tubos. O RNA foi precipitado com 500µl de álcool isopropílico 100% e permaneceu a -20°C por pelo menos 12 horas.

No dia seguinte, a amostra foi centrifugada a 4°C por 20 minutos a 13.200 rpm, desprezando-se o sobrenadante a seguir. Foi acrescentado 1000µl de etanol 75% seguido novamente de centrifugação refrigerada por 5 minutos a 13.200 rpm. A fase superior foi desprezada e o precipitado seco dissolvido com água tratada com DEPC por pelo menos 15 minutos. Esse material foi, em seguida, aliquotado, identificado e armazenado a -80°C.

Para verificação da integridade do RNA obtido, cada amostra foi, ao final da etapa descrita acima, submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% para RNA.

3.12.2. Síntese de cDNA

A transcrição reversa foi realizada utilizando o kit comercial (Applied Biosystems) High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit de acordo com as instruções do fabricante para a síntese do cDNA (DNA complementar). Para cada 1 µg RNA, foi adicionado 2,5 µl de RT Buffer; seguido de 1,0 µl de dNTP's; 2,5 µl Random Primers e 1,25 µl da enzima MultiScribe™. Em seguida foi levado ao termociclador nas condições padrão, onde o cDNA foi sintetizado a partir do RNA da amostra.

Para testar a integridade das amostras de cDNA a serem analisadas, realizou-se a reação de RT-PCR para o gene *GAPDH*. Este gene de referência endógena ou *housekeeping* codifica a proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), expressa em todas as células nucleadas. A sequência de nucleotídeos utilizada para o estudo flanqueia a região de transição dos éxons 3 e 4 até parte do éxon 4 deste gene. Este *primer*, cuja seqüência flanqueia uma região de junção éxon-éxon, dificulta a amplificação de produtos não desejados como, por exemplo, amplificação de possível DNA genômico presente na amostra.

3.12.3. PCR Quantitativo em Tempo Real (RQ-PCR)

O nível de expressão de mRNA dos genes endotelina-1, receptores ET_A e ET_B e do gene de referência endógena *GAPDH* foram quantificados através da técnica de RQ-PCR. Todas as reações foram realizadas no aparelho *Gene Amp® 7500 Sequence Detection System* (PE Applied Biosystems).

As reações foram preparadas utilizando-se o sistema comercialmente disponível *TaqMan assay-on-demand* (Applied Biosystems) para cada gene: Endotelina assay ID: Rn00561129_m1, Receptor ET_A assay ID: Rn00561137_m1, Receptor ET_B Assay ID: Rn00569139_m1, *GAPDH* assay ID: Rn99999916_s1. O preparo e armazenamento foram realizados segundo as instruções do fabricante. A amplificação foi realizada em um volume final de 10 µl, utilizando 5,0 µl do reagente específico TaqMan Master Mix; 0,5 µl de cada sonda taqman e 4,5 µl de cDNA diluído 1:10. As condições padrão de amplificação foram 50°C por 2 minutos, 95°C por 10

minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão, simultâneos).

As amostras de cada gene do estudo foram testadas em duplicata. Somente foram consideradas para análise as amostras cuja diferença de amplificação entre as duplicatas não excedeu meio ciclo. Nos casos onde houve algum tipo de contaminação nos controles “brancos”, o resultado da reação foi desconsiderado e uma nova reação foi realizada. A leitura pelo aparelho da reação de RQ-PCR tempo real é fornecida na forma do número de ciclos de PCR a partir da qual um determinado nível de fluorescência torna-se significativamente detectável (ciclo *threshold* ou “Ct”). O *threshold* foi determinado individual e manualmente para todos os genes em estudo. Em todos os casos, o Ct foi fixado no início da fase exponencial da reação de PCR (equivalente a porção linear da curva de fluorescência). Todas as leituras das amostras testadas posteriormente foram efetuadas utilizando-se o mesmo *threshold* (VAN DER VELDEN et al., 2003).

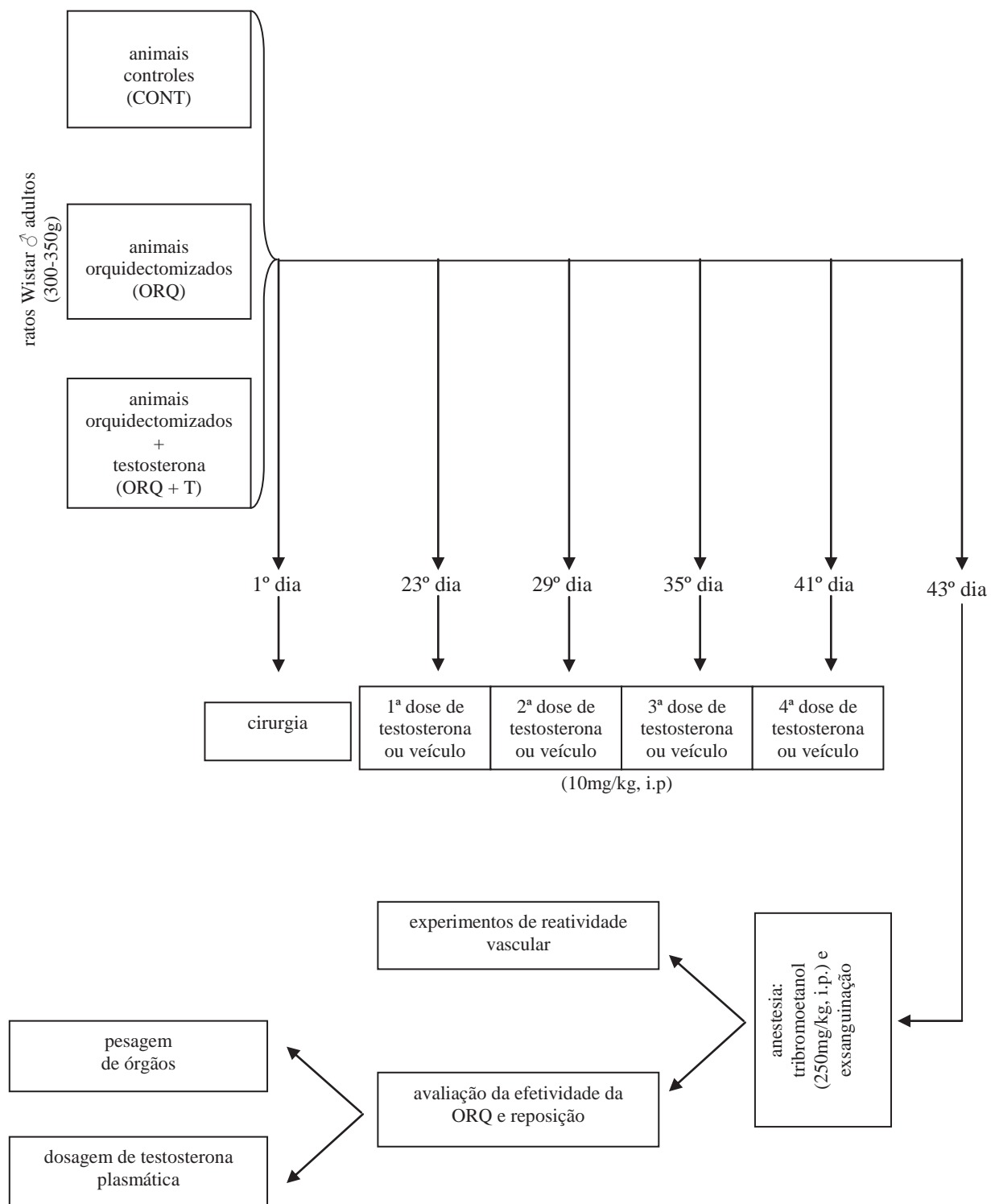
Os valores de Ct foram fornecidos pelo software do aparelho *Gene Amp® 7500 Sequence Detection System* e exportados para uma planilha do MS Excel (Microsoft Inc.) para análise. Utilizou-se a média aritmética dos valores de Ct encontrados para cada amostra testada em duplicata. Este valor foi aplicado na equação da curva-padrão do gene cuja expressão desejava-se determinar e, em seguida, transformado em notação logarítmica.

A seguir, o *log* da quantidade de mRNA de cada amostra foi normalizado em relação ao gene de referência endógena. Para normalização, cada um dos valores anteriormente obtidos foi dividido pelo valor de expressão correspondente do gene *GAPDH*. Esta ferramenta é utilizada para minimizar os erros resultantes das diferenças de eficiência da transcrição reversa e, para correção de variação entre amostras. O valor absoluto da expressão de cada amostra foi então calculado dividindo-se o valor normalizado da amostra cuja expressão desejava-se conhecer pelo valor normalizado encontrado para a amostra padrão ou calibrador. Os valores em termos de nível de expressão gênica relativa foram obtidos de forma aproximada, aplicando a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

3.13. 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, 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.

3.14. Diagrama experimental



3.15. Drogas e Reagentes

- bicarbonato de sódio P.A. (Synth, Brasil)
- 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)
- endotelina-1 (endothelin , 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.)
- ioimbina (yohimbine hydrochloride, Sigma Co., E.U.A.)
- kits de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Applied Biosystems™, E.U.A.)
- L-NAME (N_ω-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride, Sigma Co., E.U.A.)
- metoxamina (methoxamine 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)
- timolol (timolol maleate salt, Sigma Co., E.U.A.)
- tribromoetanol (2,2,2-tribromoethanol, Acros Organics, E.U.A.)
- trizol (Life Technologies, Gaithersburg, MD, E.U.A.)

Resultados

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

4.1.1. Dosagem de testosterona plasmática

A orquidectomia reduziu significativamente o nível de testosterona plasmática. No entanto, a reposição hormonal não apenas restaurou os níveis plasmáticos mas resultou em um nível plasmático mais elevado de testosterona do que o observado nos animais controles e orquidectomizados (Figura 1).

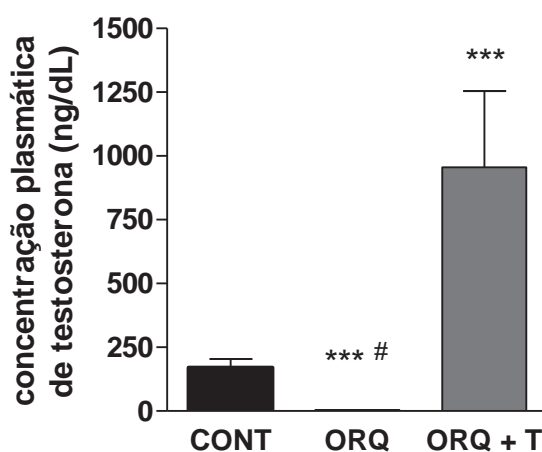


Figura 1- Concentração plasmática de testosterona (ng/dL) de animais controles (CONT), orquidectomizados (ORQ) e orquidectomizados seguidos por reposição com testosterona (ORQ+T) (n = 10-12). *** indica diferença significativa ($P < 0,001$) em relação aos animais CONT; # indica diferença significativa ($P < 0,001$) em relação aos animais ORQ+T. ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

4.1.2. Pesagens

4.1.2.1. Pesagem dos animais

Na primeira pesagem dos animais, realizada no dia do procedimento cirúrgico, não foram constatadas diferenças significativas entre o peso corporal dos animais em decorrência da orquidectomia ou da reposição hormonal com testosterona.

(Figura 2A). Contudo, a segunda pesagem realizada no dia dos experimentos de reatividade vascular mostrou uma redução no peso dos animais orquidectomizados frente ao peso dos animais controles e orquidectomizados seguidos de reposição hormonal (Figura 2B).

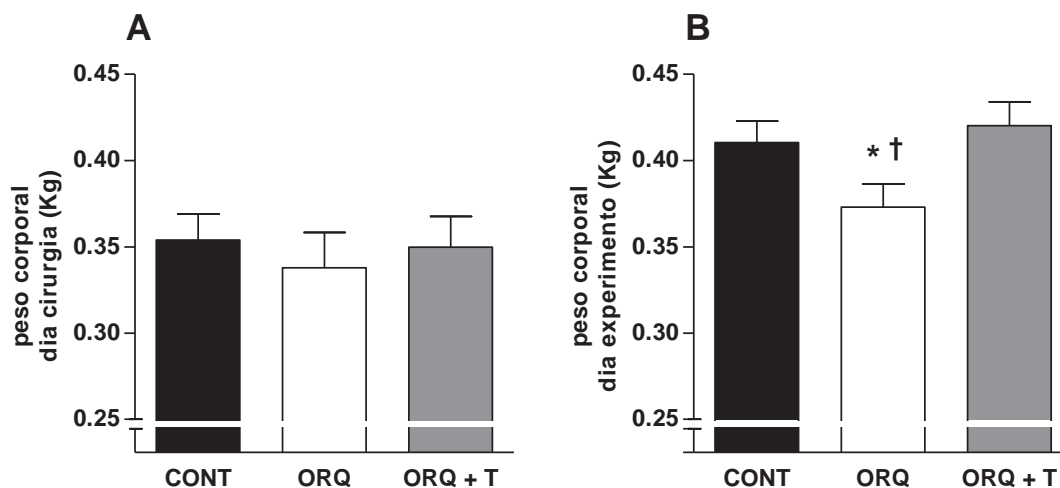


Figura 2- Peso corporal dos animais controles (CONT), orquidectomizados (ORQ) e orquidectomizados seguidos por reposição com testosterona (ORQ+T), em quilogramas (kg), obtidos no dia da cirurgia (A) e no dia do experimento de reatividade vascular (B) (n = 10-12). * indica diferença significativa ($P < 0,05$) em relação aos animais CONT; † indica diferença significativa ($P < 0,05$) em relação aos animais ORQ + T. ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

4.1.2.2. *Pesagem dos órgãos sexuais acessórios hormônio-dependentes e glândulas adrenais*

Na Figura 3 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 atrofia das vesículas seminais esvaziadas ou não do líquido seminal, atrofia esta que foi completamente revertida pela reposição hormonal com testosterona (Figuras 3A e 3B). Neste sentido, o volume de líquido seminal foi reduzido pela orquidectomia e restabelecido pela reposição hormonal (Figura 3C). Evento semelhante foi observado com a próstata e epidídimos, ou seja, a orquidectomia promoveu uma atrofia significativa desses órgãos que foi

completamente revertida pela reposição hormonal com testosterona (Figuras 3D e 3E). Um fenômeno ligeiramente distinto ocorreu nos ductos deferentes (Figura 3F), onde a orquidectomia promoveu uma atrofia significativa dessas estruturas, contudo, a reposição hormonal reverteu apenas parcialmente essa atrofia.

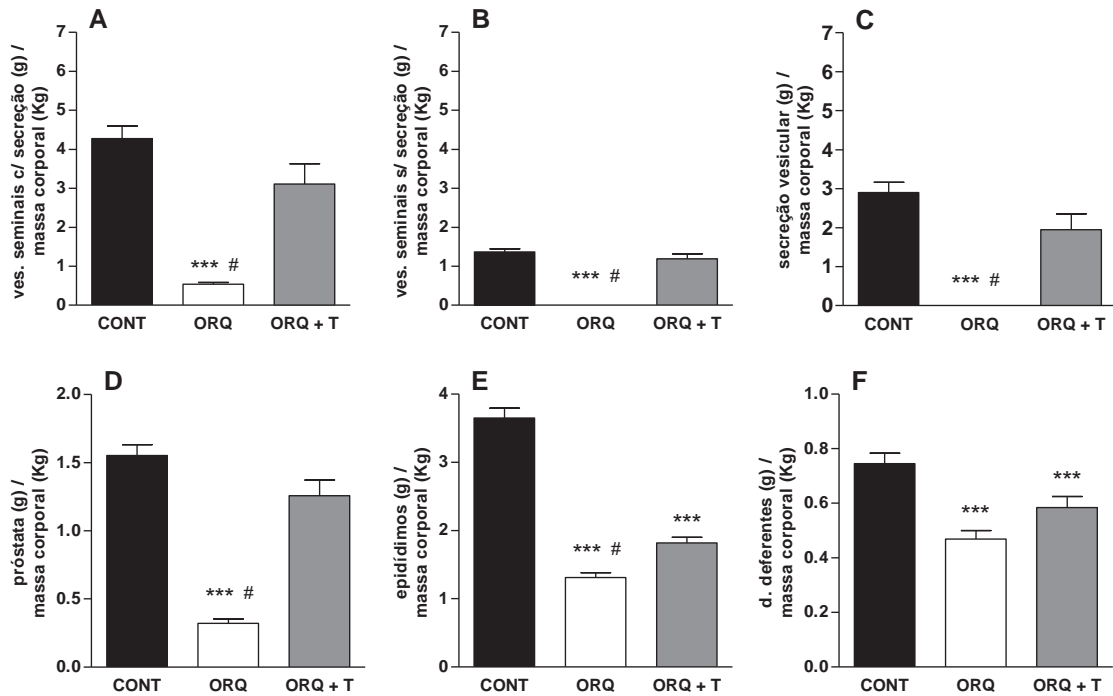


Figura 3- Peso da vesícula seminal com (A) e sem (B) secreção, bem como da secreção seminal (C), além da próstata (D), epidídimos (E) e ductos deferentes (F) obtidos de animais controles (CONT), orquidectomizados (ORQ) e orquidectomizados submetidos à reposição com testosterona (ORQ+T) (n = 10-12). *** indica diferença significativa ($P < 0,001$) em relação aos animais CONT; # indica diferença significativa ($P < 0,001$) em relação aos animais ORQ + T. (ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

Na Figura 4 é apresentado o peso das glândulas adrenais normalizado pelo peso corporal total dos animais estudados. Observa-se um aumento do peso das glândulas adrenais em decorrência da orquidectomia, aumento este que é completamente revertido pela reposição hormonal com testosterona.

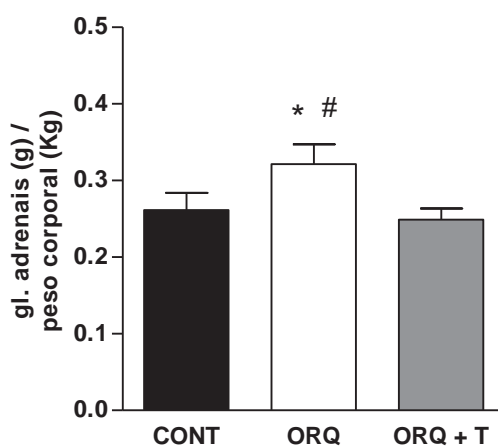


Figura 4- Peso das glândulas adrenais obtidos de animais controles (CONT), orquidectomizados (ORQ) e orquidectomizados submetidos à reposição com testosterona (ORQ+T) (n = 10-12). * indica diferença significativa ($P < 0,05$) em relação aos animais CONT; # indica diferença significativa ($P < 0,05$) em relação aos animais ORQ+ T. (ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

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

4.2.1. Estudo das respostas vasomotoras de preparações de veia porta à clonidina e à metoxamina

A orquidectomia, seguida ou não pela reposição hormonal com testosterona, não modificou significativamente o padrão das curvas concentração-resposta para clonidina (Figura 5A) e metoxamina (Figura 5B) determinadas em preparações isoladas de veia porta. Dessa forma, não foram observadas diferenças significativas em relação aos parâmetros de R_{max} e pEC_{50} para clonidina e metoxamina obtidos nessas preparações (Tabela 1).

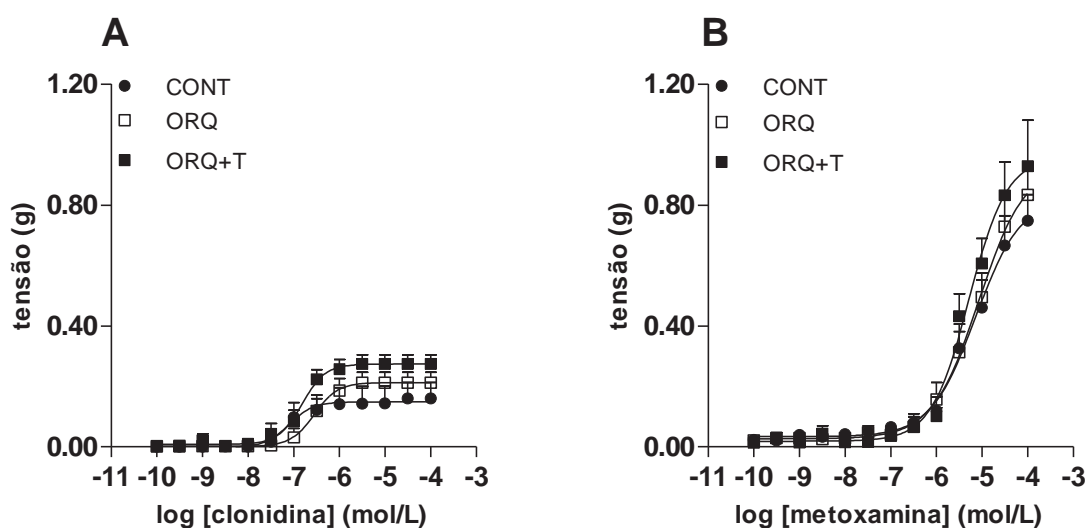


Figura 5- Curvas concentração-resposta para clonidina (A) e metoxamina (B) obtidas de preparações de veia porta isoladas de animais controles (CONT; ●), orquidectomizados (ORQ; □) e orquidectomizados submetidos à reposição com testosterona (ORQ+T; ■) (n = 10-12).

Tabela 1- Valores de R_{max} e pEC_{50} para clonidina e metoxamina determinados em preparações de veia porta de animais controle e orquidectomizados, submetidos ou não à reposição hormonal com testosterona

| | R_{max} | | | pEC_{50} | | |
|-------------------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|
| | CONT | ORQ | ORQ+T | CONT | ORQ | ORQ+T |
| Veia Porta | | | | | | |
| <i>clonidina</i> | 0,16±0,05 | 0,21±0,03 | 0,27±0,03 | 6,00±1,00 | 6,52±0,13 | 6,89±0,17 |
| <i>metoxamina</i> | 0,75±0,08 | 0,83±0,11 | 0,93±0,15 | 5,08±0,16 | 5,13±0,18 | 5,28±0,10 |

4.2.2. Estudo das respostas vasomotoras de preparações de veia porta à noradrenalina na vigência do bloqueio dos receptores β ou α_2 -adrenérgicos

A orquidectomia tampouco a reposição hormonal com testosterona não modificaram significativamente o padrão das curvas concentração-resposta para noradrenalina determinadas em preparações isoladas de veia porta incubadas com timolol $10^{-6}M$ (Figura 6A) e/ou timolol $10^{-6}M$ + ioimbina $10^{-6}M$ (Figura 6B). Neste sentido, as preparações obtidas de animais orquidectomizados tratados ou não com

testosterona também não apresentaram diferenças significativas em termos de R_{max} e pEC_{50} para noradrenalina na presença de timolol ou timolol+ioimbina (Tabela 2).

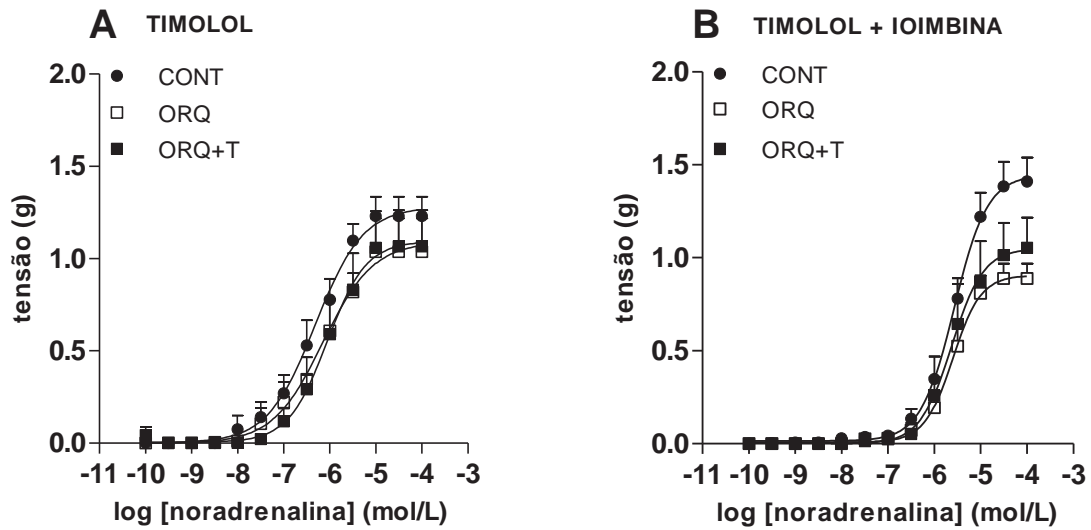


Figura 6- Curvas concentração-resposta para noradrenalina obtidas de preparações de veia porta isoladas de animais controles (CONT; ●), orquidectomizados (ORQ; □) e orquidectomizados submetidos à reposição com testosterona (ORQ+T; ■), previamente incubadas com timolol $10^{-6}M$ (A) e timolol $10^{-6}M$ + ioimbina $10^{-6}M$ (B) ($n = 10-12$).

Tabela 2- Valores de R_{max} e pEC_{50} para noradrenalina determinados em preparações de veia porta de animais controle e orquidectomizados, submetidos ou não à reposição hormonal com testosterona, pré-tratadas com timolol $10^{-6}M$ e timolol $10^{-6}M$ + ioimbina $10^{-6}M$

| | R_{max} | | | pEC_{50} | | |
|---------------------------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|
| | CONT | ORQ | ORQ+T | CONT | ORQ | ORQ+T |
| Veia Porta | | | | | | |
| <i>noradrenalina</i> | | | | | | |
| <i>timolol</i> | 1,23±0,10 | 1,04±0,18 | 1,07±0,20 | 6,48±0,21 | 6,39±0,28 | 6,02±0,15 |
| <i>timolol + ioimbina</i> | 1,41±0,13 | 0,89±0,08 | 1,05±0,16 | 5,63±0,14 | 5,62±0,16 | 5,29±0,21 |

4.2.3. Estudo dos mecanismos relacionados à endotelina-1 em preparações de veia porta obtidas de animais orquidectomizados, submetidos ou não à reposição hormonal com testosterona

4.2.3.1. Estudo funcional das respostas vasomotoras de veia porta à endotelina-1

A orquidectomia não modificou significativamente o padrão das curvas concentração-resposta para endotelina-1 determinadas em preparações isoladas de veia porta (Figura 7). Neste sentido, as preparações obtidas de animais orquidectomizados também não apresentaram diferenças significativas em termos de R_{max} e pEC_{50} para endotelina-1 (Tabela 3).

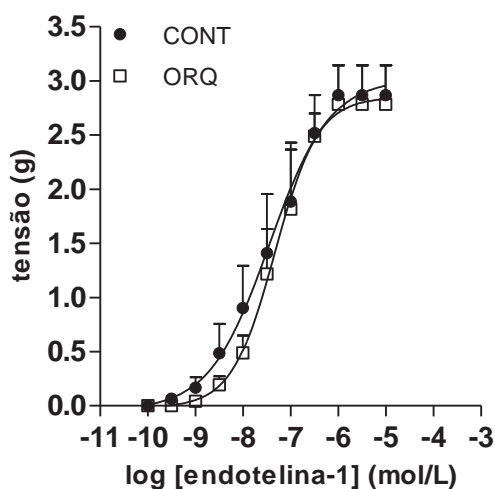


Figura 7- Curvas concentração-resposta para endotelina-1 obtidas de preparações de veia porta isoladas de animais controles (CONT; ●), orquidectomizados (ORQ; □) e orquidectomizados submetidos à reposição com testosterona (ORQ+T; ■) (n = 4-5).

Tabela 3- Valores de R_{max} e pEC_{50} para endotelina-1 determinados em preparações de veia porta de animais controle e orquidectomizados

| | R_{max} | | pEC_{50} | |
|-------------------|-----------|-----------|------------|-----------|
| | CONT | ORQ | CONT | ORQ |
| Veia Porta | | | | |
| endotelina-1 | 2,87±0,27 | 2,78±0,36 | 7,60±0,39 | 7,25±0,21 |

4.2.3.2. Estudo da expressão de mRNA para endotelina-1 e para os receptores ET_A e ET_B de endotelina-1 em veia porta isolada de rato

A orquidectomia promoveu aumento da expressão de ET-1 em veia porta isolada de rato, aumento este completamente revertido pela reposição hormonal com testosterona (Figura 8A). Contudo, nem a orquidectomia nem a reposição hormonal com testosterona modificaram a expressão local de receptores ET_A (Figura 8B). Por outro lado, a expressão de receptores ET_B foi aumentada em decorrência da orquidectomia e restaurada pela reposição hormonal com testosterona (Figura 8C).

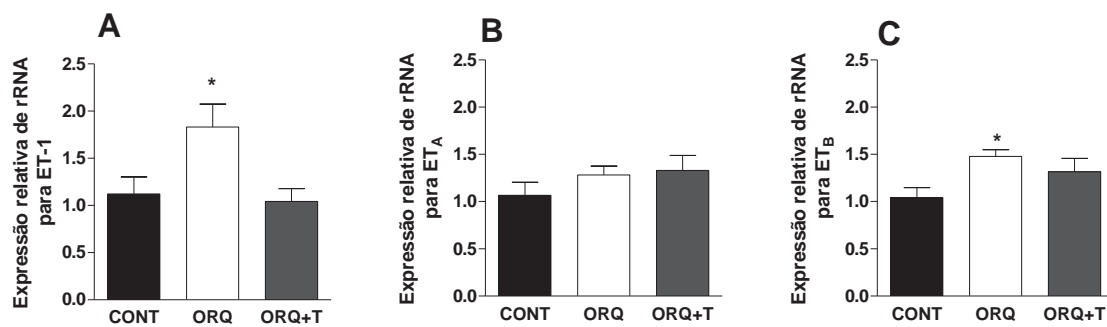


Figura 8- Expressão gênica relativa para endotelina-1 (ET-1) e subtipos de receptores ET_A e ET_B detectada em veia porta isolada de animais controles (CONT), orquidectomizados (ORQ) e orquidectomizados seguidos por reposição com testosterona (ORQ+T) (n = 6). * indica diferença significativa ($P < 0,05$) em relação aos animais CONT. ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

4.2.4. Estudo das respostas vasomotoras de preparações de veias pulmonar, renal, femoral e mesentérica obtidas de animais orquidectomizados, submetidos ou não à reposição de testosterona, à fenilefrina, noradrenalina, clonidina e metoxamina

4.2.4.1. Veia pulmonar

A orquidectomia tampouco a reposição hormonal com testosterona não modificaram significativamente o padrão das curvas concentração-resposta para fenilefrina (Figura 9A), noradrenalina (Figura 9B), clonidina (Figura 9C) e metoxamina (Figura 9D) determinadas em preparações isoladas de veia pulmonar. Conseqüentemente, nenhuma modificação significativa de R_{max} e pEC_{50} para fenilefrina, noradrenalina, clonidina e metoxamina foi detectada nas preparações estudadas, em decorrência da orquidectomia seguida ou não de reposição hormonal com testosterona (Tabela 4). Vale ressaltar que nas preparações de veias pulmonares, bem como nas outras preparações estudadas, não foi calculado o pEC_{50} da clonidina e da metoxamina.

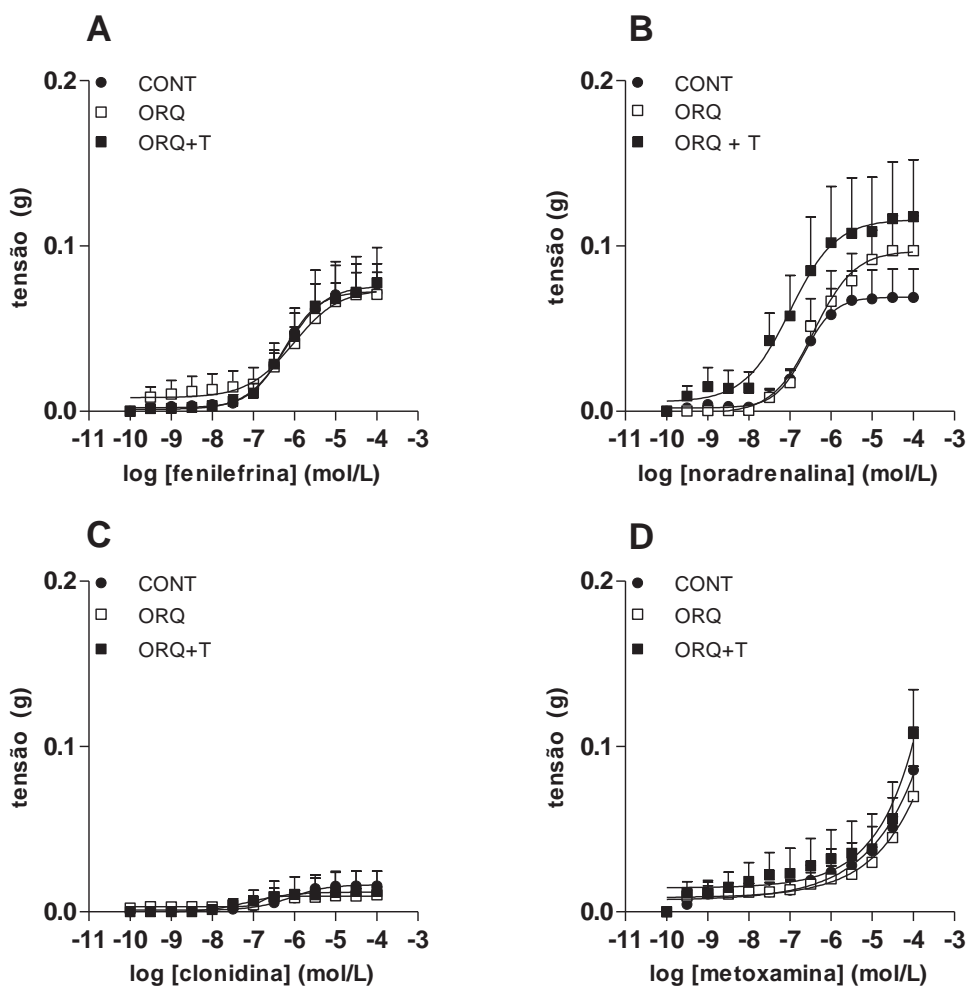


Figura 9- Curvas concentração-resposta para fenilefrina (A), noradrenalina (B), clonidina (C) e metoxamina (D) obtidas de preparações de veia pulmonar isoladas de animais controles (CONT; ●), orquidectomizados (ORQ; □) e orquidectomizados submetidos à reposição com testosterona (ORQ+T; ■) (n = 10-12).

Tabela 4- Valores de R_{max} e pEC_{50} para fenilefrina, noradrenalina, clonidina e metoxamina determinados em preparações de veia pulmonar de animais controle e orquidectomizados, submetidos ou não à reposição hormonal com testosterona

| | R_{max} | | | pEC_{50} | | |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|------------|
| | CONT | ORQ | ORQ+T | CONT | ORQ | ORQ+T |
| Veia Pulmonar | | | | | | |
| <i>fenilefrina</i> | 0,07±0,02 | 0,07±0,01 | 0,08±0,02 | 6,17±0,16 | 6,04±0,18 | 5,89±0,134 |
| <i>noradrenalina</i> | 0,07±0,02 | 0,10±0,02 | 0,12±0,03 | 6,51±0,26 | 6,35±0,22 | 6,85±0,19 |
| <i>clonidina</i> | 0,01±0,01 | 0,01±0,00 | 0,01±0,01 | ND | ND | ND |
| <i>metoxamina</i> | 0,08±0,02 | 0,07±0,02 | 0,11±0,03 | ND | ND | ND |

^a ND (não determinado)

4.2.4.2. Veia renal

A orquidectomia, seguida ou não pela reposição hormonal com testosterona, não modificou significativamente o padrão das curvas concentração-resposta para fenilefrina (Figura 10A), noradrenalina (Figura 10B), clonidina (Figura 10C) e metoxamina (Figura 10D) determinadas em preparações isoladas de veia renal. Dessa forma, não foram observadas diferenças significativas em relação aos parâmetros de R_{max} e pEC_{50} para fenilefrina, noradrenalina, clonidina e metoxamina obtidos nessas preparações (Tabela 5).

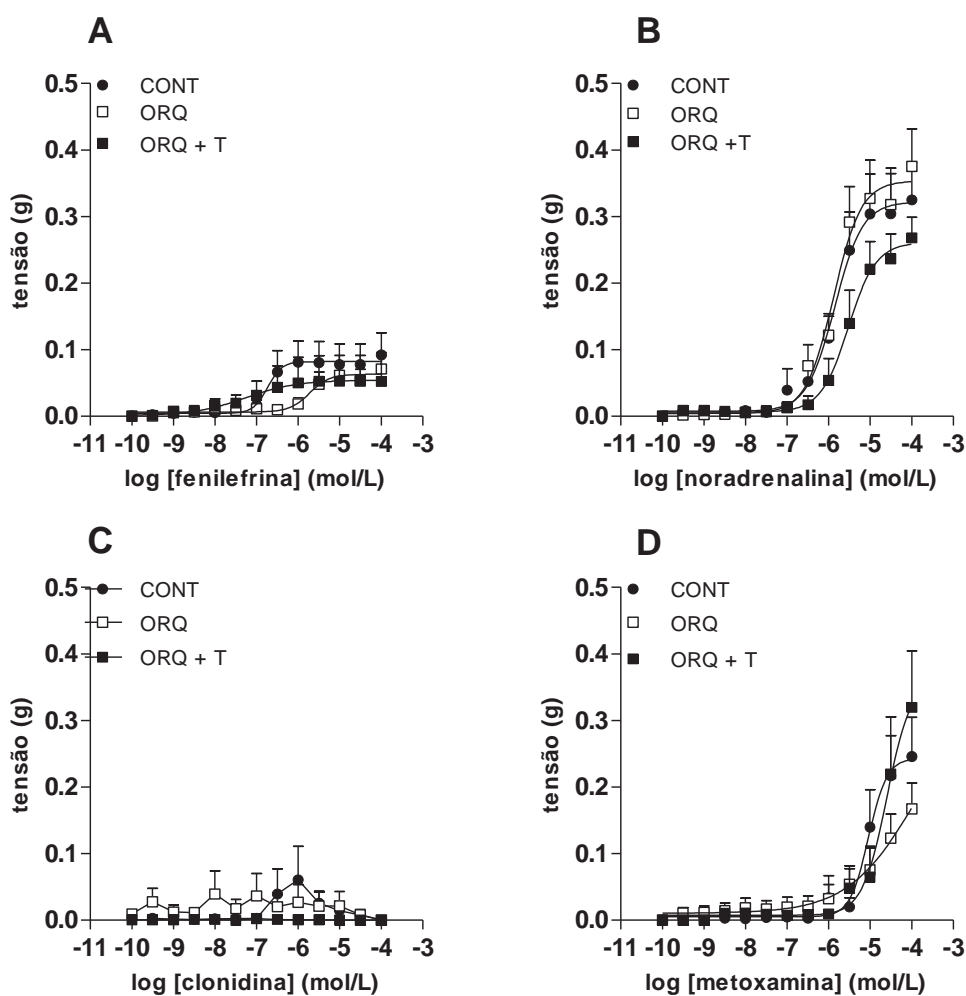


Figura 10- Curvas concentração-resposta para fenilefrina (A), noradrenalina (B), clonidina (C) e metoxamina (D) obtidas de preparações de veia renal isoladas de animais controles (CONT; ●), orquidectomizados (ORQ; □) e orquidectomizados submetidos à reposição com testosterona (ORQ+T; ■) (n = 10-12).

Tabela 5- Valores de R_{max} e pEC_{50} para fenilefrina, noradrenalina, clonidina e metoxamina determinados em preparações de veia renal de animais controle e orquidectomizados, submetidos ou não à reposição hormonal com testosterona

| | R_{max} | | | pEC_{50} | | |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|
| | CONT | ORQ | ORQ+T | CONT | ORQ | ORQ+T |
| Veia Renal | | | | | | |
| <i>fenilefrina</i> | 0,09±0,03 | 0,07±0,02 | 0,05±0,04 | 6,34±0,51 | 6,57±0,44 | 7,56±0,58 |
| <i>noradrenalina</i> | 0,35±0,05 | 0,37±0,06 | 0,27±0,03 | 5,68±0,16 | 5,27±0,61 | 5,29±0,29 |
| <i>clonidina</i> | 0,01±0,01 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | ND | ND | ND |
| <i>metoxamina</i> | 0,25±0,06 | 0,17±0,04 | 0,32±0,08 | ND | ND | ND |

^a ND (não determinado)

4.2.4.3. Veia femoral

Em preparações isoladas de veia femoral a orquidectomia, seguida ou não de reposição hormonal com testosterona, não produziu modificações significativas no padrão das curvas concentração-resposta para fenilefrina (Figura 11A), noradrenalina (Figura 11B), clonidina (Figura 11C) e metoxamina (Figura 11D), quando comparadas com as curvas obtidas de animais controles. Sendo assim, nenhuma diferença significativa foi observada em relação aos parâmetros de R_{max} e pEC_{50} para fenilefrina, noradrenalina, clonidina e metoxamina (Tabela 6).

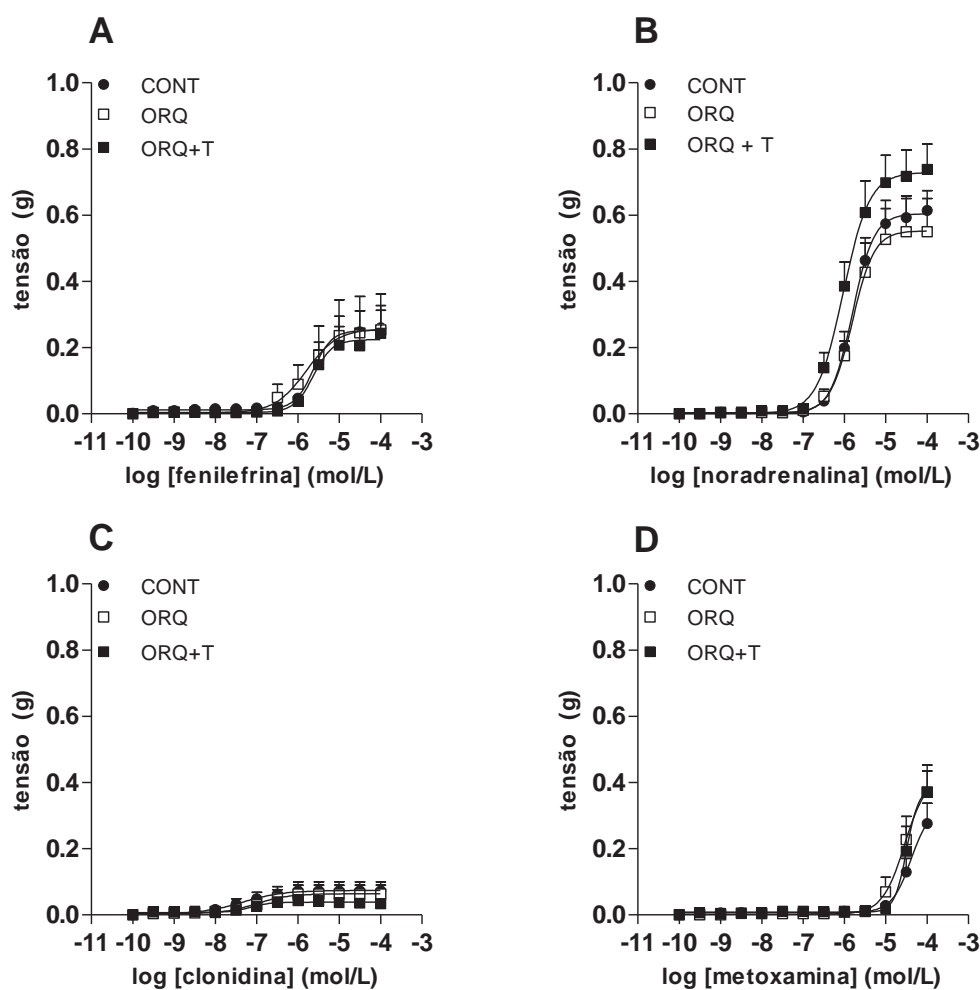


Figura 11- Curvas concentração-resposta para fenilefrina (A), noradrenalina (B), clonidina (C) e metoxamina (D) obtidas de preparações de veia femoral isoladas de animais controles (CONT; ●), orquidectomizados (ORQ; □) e orquidectomizados submetidos à reposição com testosterona (ORQ+T; ■) (n = 10-12).

Tabela 6- Valores de R_{max} e pEC_{50} para fenilefrina, noradrenalina, clonidina e metoxamina determinados em preparações de veia femoral de animais controle e orquidectomizados, submetidos ou não à reposição hormonal com testosterona

| | R_{max} | | | pEC_{50} | | |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|
| | CONT | ORQ | ORQ+T | CONT | ORQ | ORQ+T |
| Veia Femoral | | | | | | |
| <i>fenilefrina</i> | 0,26±0,07 | 0,25±0,11 | 0,24±0,07 | 5,66±0,12 | 5,45±0,18 | 5,58±0,12 |
| <i>noradrenalina</i> | 0,61±0,06 | 0,55±0,10 | 0,74±0,08 | 5,39±0,36 | 5,78±0,07 | 5,86±0,14 |
| <i>clonidina</i> | 0,07±0,03 | 0,06±0,03 | 0,03±0,01 | ND | ND | ND |
| <i>metoxamina</i> | 0,28±0,06 | 0,37±0,06 | 0,37±0,08 | ND | ND | ND |

^a ND (não determinado)

4.2.4.4. Veia mesentérica

A orquidectomia tampouco a reposição hormonal com testosterona não modificaram significativamente o padrão das curvas concentração-resposta para fenilefrina (Figura 12A) e noradrenalina (Figura 12B) determinadas em preparações isoladas de veia mesentérica. Neste sentido, as preparações obtidas de animais orquidectomizados tratados ou não com testosterona também não apresentaram diferenças significativas de R_{max} e pEC_{50} para fenilefrina e noradrenalina (Tabela 7).

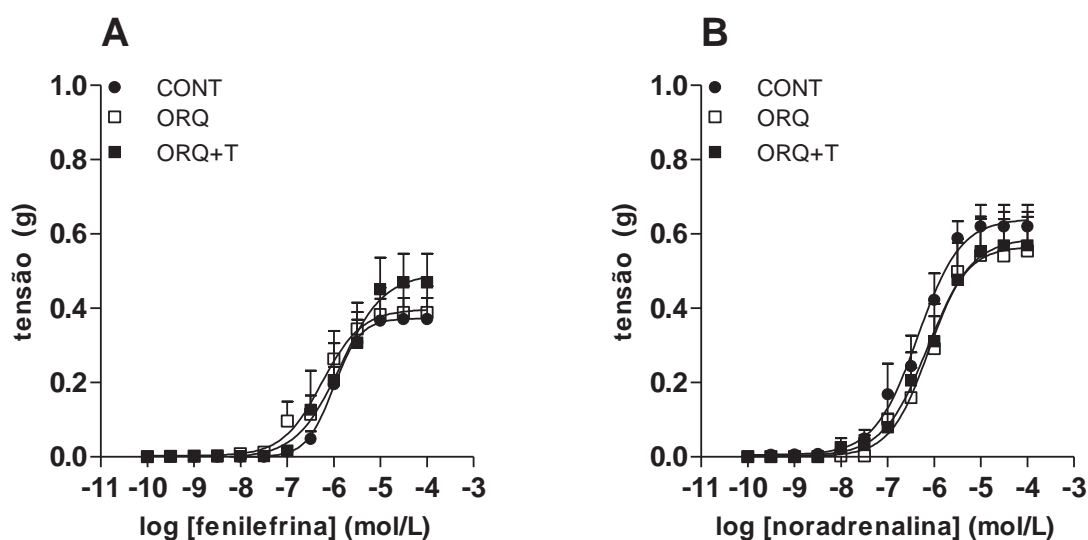


Figura 12- Curvas concentração-resposta para fenilefrina (A) e noradrenalina (B) obtidas de preparações de veia mesentérica isoladas de animais controles (CONT; ●), orquidectomizados (ORQ; □) e orquidectomizados submetidos à reposição com testosterona (ORQ+T; ■) (n = 10-12).

Tabela 7- Valores de R_{max} e pEC_{50} para fenilefrina e noradrenalina determinados em preparações de veia mesentérica de animais controle e orquidectomizados, submetidos ou não à reposição hormonal com testosterona

| | R_{max} | | | pEC_{50} | | |
|-------------------------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|
| | CONT | ORQ | ORQ+T | CONT | ORQ | ORQ+T |
| Veia Mesentérica | | | | | | |
| <i>fenilefrina</i> | 0,37±0,06 | 0,39±0,07 | 0,47±0,08 | 5,92±0,14 | 6,20±0,16 | 5,80±0,20 |
| <i>noradrenalina</i> | 0,62±0,06 | 0,55±0,09 | 0,57±0,09 | 6,39±0,16 | 6,34±0,21 | 6,10±0,22 |

4.2.5. Estudo das respostas vasomotoras de preparações de artérias pulmonar, femoral, mesentérica, aorta torácica e aorta abdominal à fenilefrina e à noradrenalina

4.2.5.1. Artéria pulmonar

A orquidectomia, seguida ou não pela reposição hormonal com testosterona, não modificou significativamente o padrão das curvas concentração-resposta para fenilefrina (Figura 13A) e noradrenalina (Figura 13B) determinadas em preparações isoladas de artéria pulmonar. Conseqüentemente, nenhuma modificação significativa de R_{max} e pEC_{50} para fenilefrina e noradrenalina (Tabela 8) foi detectada nas preparações estudadas, em decorrência da orquidectomia seguida ou não de reposição hormonal com testosterona.

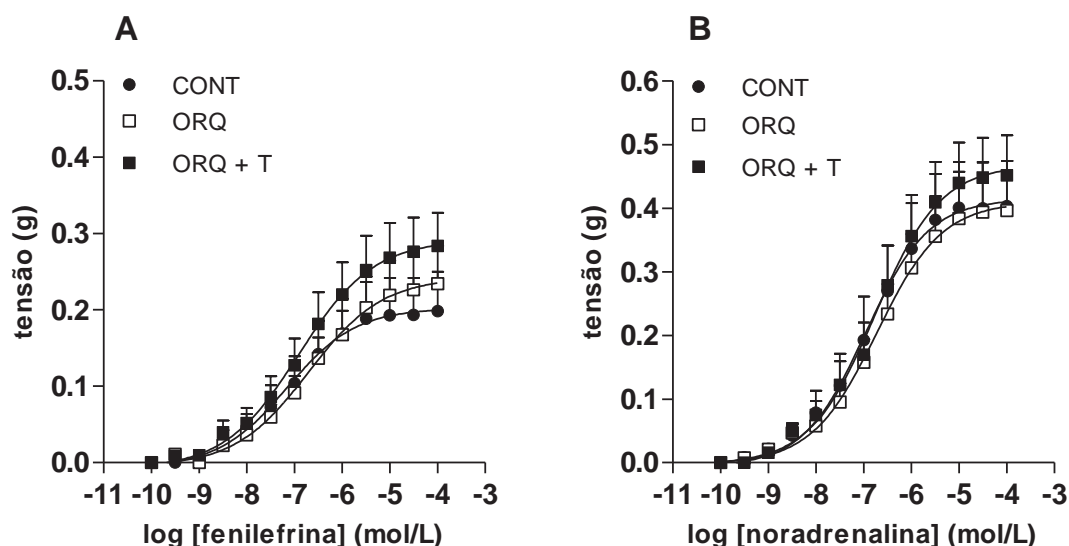


Figura 13- Curvas concentração-resposta para fenilefrina (A) e noradrenalina (B) obtidas de preparações de artéria pulmonar isoladas de animais controles (CONT; ●), orquidectomizados (ORQ; □) e orquidectomizados submetidos à reposição com testosterona (ORQ+T; ■) (n = 10-12).

Tabela 8- Valores de R_{max} e pEC_{50} para fenilefrina e noradrenalina determinados em preparações de artéria pulmonar de animais controle e orquidectomizados, submetidos ou não à reposição hormonal com testosterona

| | R_{max} | | | pEC_{50} | | |
|-------------------------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|
| | CONT | ORQ | ORQ+T | CONT | ORQ | ORQ+T |
| Artéria Pulmonar | | | | | | |
| <i>fenilefrina</i> | 0,20±0,05 | 0,23±0,05 | 0,28±0,04 | 6,89±0,22 | 7,88±0,94 | 6,40±0,62 |
| <i>noradrenalina</i> | 0,40±0,07 | 0,40±0,08 | 0,45±0,06 | 7,82±1,05 | 7,00±0,35 | 6,71±0,18 |

4.2.5.2. Artéria femoral

Em preparações isoladas de artéria femoral a orquidectomia induziu aumento de resposta vasomotora frente à fenilefrina, aumento este que não foi revertido com a reposição hormonal com testosterona (Figura 14A). Dessa forma, um aumento de R_{max} pode ser observado em preparações obtidas de animais orquidectomizados, seguidos ou não de reposição hormonal com testosterona, sem alterações significativas de pEC_{50} (Tabela 9). Contudo, a orquidectomia, seguida ou não pela reposição hormonal com testosterona, não modificou significativamente o padrão das curvas concentração-resposta para noradrenalina determinadas em preparações isoladas de artéria femoral (Figura 14B). Conseqüentemente, nenhuma modificação significativa de R_{max} e pEC_{50} para noradrenalina (Tabela 9) foi detectada nas preparações estudadas, em decorrência da orquidectomia seguida ou não de reposição hormonal com testosterona.

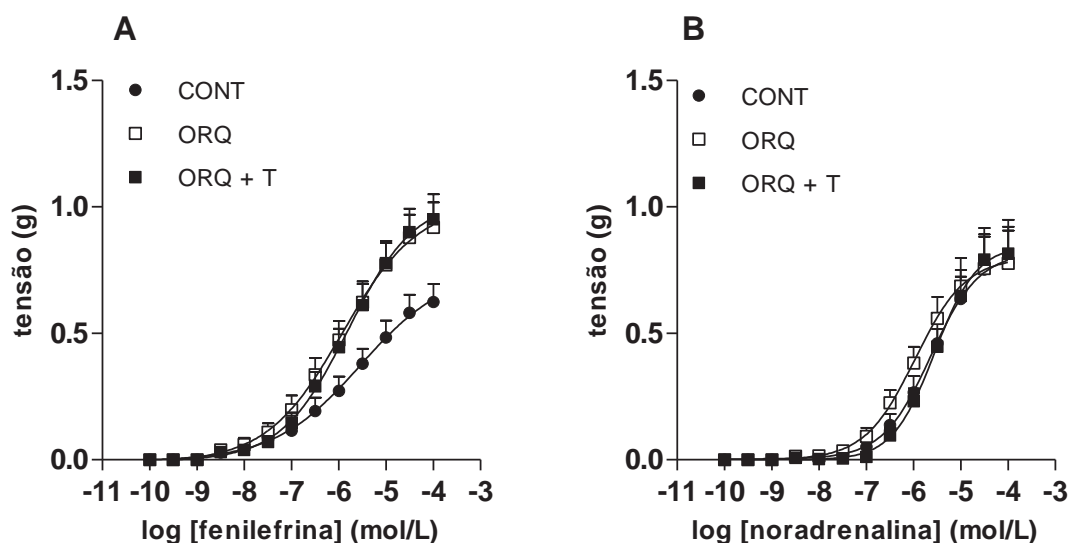


Figura 14- Curvas concentração-resposta para fenilefrina (A) e noradrenalina (B) obtidas de preparações de artéria femoral isoladas de animais controles (CONT; ●), orquidectomizados (ORQ; □) e orquidectomizados submetidos à reposição com testosterona (ORQ+T; ■) (n = 10-12). ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

Tabela 9- Valores de R_{max} e pEC_{50} para fenilefrina e noradrenalina determinados em preparações de artéria femoral de animais controle e orquidectomizados, submetidos ou não à reposição hormonal com testosterona

| | R_{max} | | | pEC_{50} | | |
|------------------------|-----------|------------|------------|------------|-----------|-----------|
| | CONT | ORQ | ORQ+T | CONT | ORQ | ORQ+T |
| Artéria Femoral | | | | | | |
| <i>fenilefrina</i> | 0,62±0,07 | 0,92±0,10* | 0,95±0,10* | 6,21±0,48 | 6,15±0,25 | 5,79±0,12 |
| <i>noradrenalina</i> | 0,78±0,14 | 0,78±0,13 | 0,81±0,13 | 5,69±0,08 | 6,00±0,10 | 5,66±0,11 |

* indica diferença significativa ($P < 0,05$) em relação aos animais CONT. ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

4.2.5.3. Artéria mesentérica

A orquidectomia, seguida ou não de reposição hormonal com testosterona, não produziu modificações significativas no padrão das curvas concentração-resposta para fenilefrina (Figura 15A) e noradrenalina (Figura 15B) determinadas em preparações isoladas de artéria mesentérica, quando comparadas com as curvas obtidas de animais controles. Sendo assim, nenhuma diferença significativa foi

observada em relação aos parâmetros de R_{max} e pEC_{50} para fenilefrina e noradrenalina nessas preparações (Tabela 10).

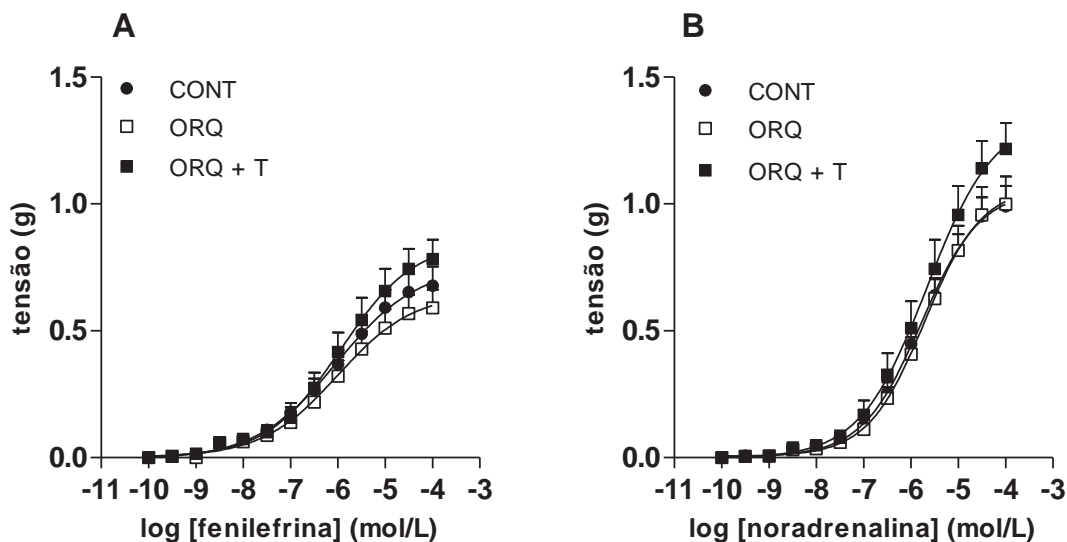


Figura 15- Curvas concentração-resposta para fenilefrina (A) e noradrenalina (B) obtidas de preparações de artéria mesentérica isoladas de animais controles (CONT; ●), orquidectomizados (ORQ; □) e orquidectomizados submetidos à reposição com testosterona (ORQ+T; ■) (n = 10-12).

Tabela 10- Valores de R_{max} e pEC_{50} para fenilefrina e noradrenalina determinados em preparações de artéria mesentérica de animais controle e orquidectomizados, submetidos ou não à reposição hormonal com testosterona

| | R_{max} | | | pEC_{50} | | |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|
| | CONT | ORQ | ORQ+T | CONT | ORQ | ORQ+T |
| Artéria Mesentérica | | | | | | |
| <i>fenilefrina</i> | 0,68±0,08 | 0,59±0,07 | 0,78±0,07 | 5,26±0,81 | 5,91±0,19 | 5,87±0,19 |
| <i>noradrenalina</i> | 0,99±0,08 | 1,00±0,11 | 1,22±0,10 | 5,80±0,12 | 5,74±0,10 | 5,26±0,50 |

4.2.5.4. Aorta torácica

A orquidectomia tampouco a reposição hormonal com testosterona não modificaram significativamente o padrão das curvas concentração-resposta para fenilefrina (Figura 16A) e noradrenalina (Figura 16B) determinadas em preparações isoladas de aorta torácica. Neste sentido, as preparações obtidas de animais

orquidectomizados tratados ou não com testosterona também não apresentaram diferenças significativas de R_{max} e pEC_{50} para fenilefrina e noradrenalina nessas preparações (Tabela 11).

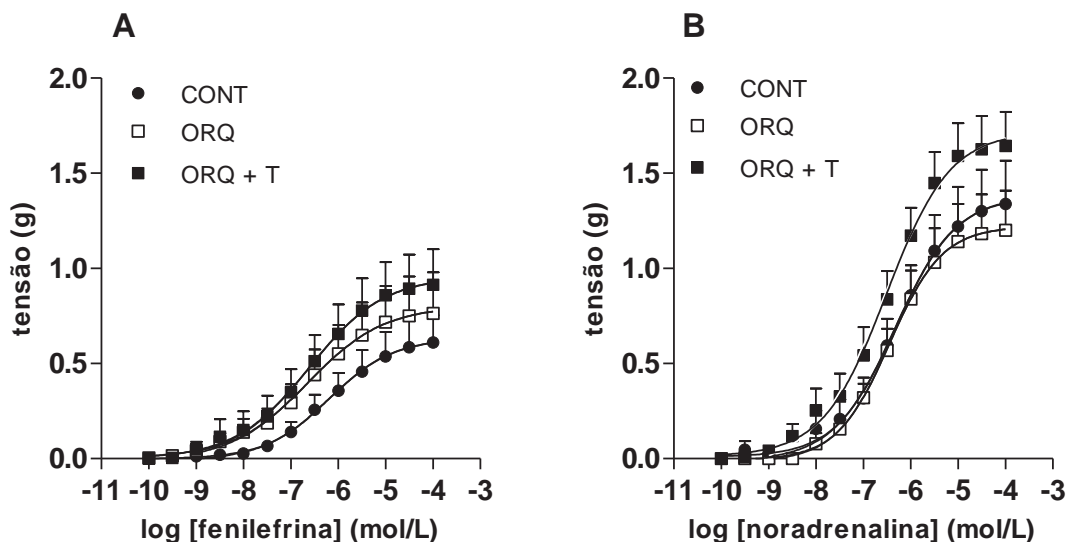


Figura 16- Curvas concentração-resposta para fenilefrina (A) e noradrenalina (B) obtidas de preparações de aorta torácica isoladas de animais controles (CONT; ●), orquidectomizados (ORQ; □) e orquidectomizados submetidos à reposição com testosterona (ORQ+T; ■) (n = 10-12).

Tabela 11- Valores de R_{max} e pEC_{50} para fenilefrina e noradrenalina determinados em preparações de aorta torácica de animais controle e orquidectomizados, submetidos ou não à reposição hormonal com testosterona

| | R_{max} | | | pEC_{50} | | |
|-----------------------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|
| | CONT | ORQ | ORQ+T | CONT | ORQ | ORQ+T |
| Aorta Torácica | | | | | | |
| <i>fenilefrina</i> | 0,58±0,15 | 0,76±0,21 | 0,91±0,18 | 5,95±0,18 | 6,84±0,17 | 7,37±0,97 |
| <i>noradrenalina</i> | 1,26±0,24 | 1,20±0,21 | 1,64±0,18 | 7,16±0,96 | 6,49±0,11 | 8,59±1,51 |

4.2.5.5. Aorta abdominal

Em preparações isoladas de aorta abdominal a orquidectomia não induziu nenhuma alteração de resposta frente à fenilefrina. Contudo, a reposição hormonal com testosterona aumentou a reatividade de aorta abdominal frente a este agonista

(Figura 17A), o que refletiu em um aumento de R_{max} em preparações obtidas de animais orquidectomizados, seguidos de reposição hormonal com testosterona, sem alteração de pEC_{50} (Tabela 12). Além disso, a reposição hormonal com testosterona aumentou a reatividade de aorta abdominal frente à noradrenalina (Figura 17B). Neste sentido, um aumento de R_{max} foi observado em preparações de aorta abdominal de animais orquidectomizados submetidos à reposição hormonal com testosterona, sem alterações de pEC_{50} (Tabela 12).

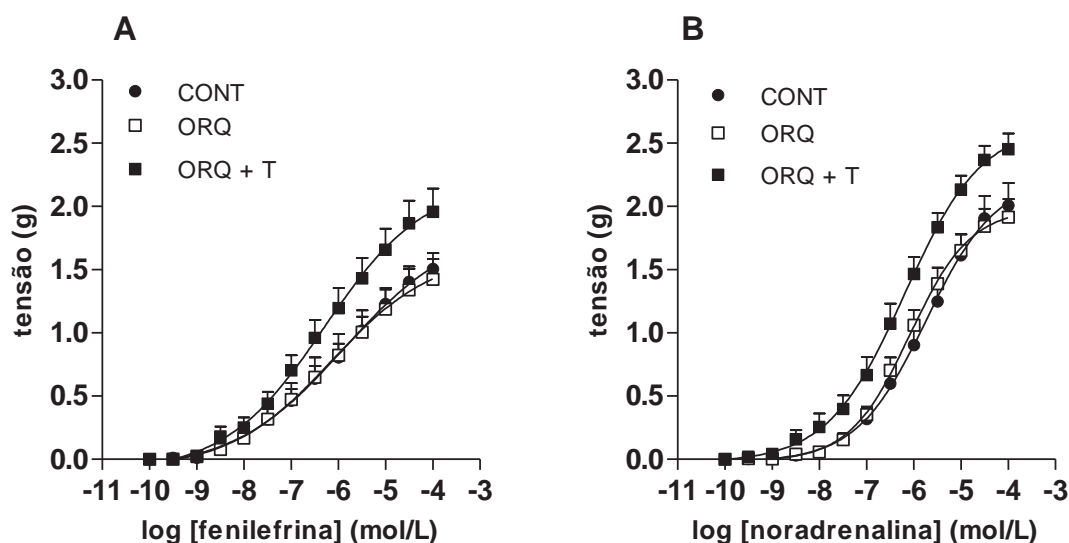


Figura 17- Curvas concentração-resposta para fenilefrina (A) e noradrenalina (B) obtidas de preparações de aorta abdominal isoladas de animais controles (CONT; ●), orquidectomizados (ORQ; □) e orquidectomizados submetidos à reposição com testosterona (ORQ+T; ■) (n = 12-14). ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

Tabela 12- Valores de R_{max} e pEC_{50} para fenilefrina e noradrenalina determinados em preparações de aorta abdominal de animais controle e orquidectomizados, submetidos ou não à reposição hormonal com testosterona

| | R_{max} | | | pEC_{50} | | |
|------------------------|-----------|-----------|---------------|------------|-----------|-----------|
| | CONT | ORQ | ORQ+T | CONT | ORQ | ORQ+T |
| Aorta Abdominal | | | | | | |
| <i>fenilefrina</i> | 1,51±0,12 | 1,42±0,16 | 1,96±0,18 * § | 6,25±0,31 | 5,65±0,53 | 6,15±0,30 |
| <i>noradrenalina</i> | 2,00±0,18 | 1,92±0,14 | 2,45±0,12 * § | 5,72±0,16 | 6,09±0,11 | 6,20±0,17 |

* indica diferença significativa ($P < 0,05$) em relação aos animais CONT; § indica diferença significativa ($P < 0,05$) em relação aos animais ORQ. ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

Discussão

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

O objetivo central do presente trabalho foi estudar a influência da orquidectomia, seguida ou não de reposição hormonal com testosterona, sobre as respostas vasomotoras de diferentes veias isoladas de rato a agonistas simpatomiméticos. No entanto, para atingir este objetivo, inicialmente precisávamos nos certificar de que o protocolo de orquidectomia utilizado era efetivo em reduzir os níveis séricos de testosterona nos animais e, conseqüentemente, promover as modificações fisiopatológicas características destas variações hormonais. Do mesmo modo, era necessário garantir que a reposição hormonal com testosterona proposta era capaz de reverter tais modificações fisiopatológicas induzidas pela orquidectomia.

As repercussões da orquidectomia, assim como da reposição hormonal com testosterona, nas concentrações plasmáticas de testosterona foi diretamente demonstrada através da dosagem de testosterona plasmática. Observou-se uma redução dos níveis plasmáticos de testosterona em animais orquidectomizados. Já para aqueles que receberam reposição hormonal, ao invés de redução, observou-se até mesmo níveis suprafisiológicos de testosterona. Esta dosagem dos níveis plasmáticos de testosterona é um parâmetro largamente empregado para validação dos procedimentos de orquidectomia e reposição hormonal com testosterona (MATSUDA et al., 1994; ROSSIGNOLI et al., 2010).

Neste sentido, observamos inicialmente que no momento da orquidectomia não houve diferença significativa de peso corporal entre os grupos estudados. Contudo, o ganho de peso no grupo de animais orquidectomizados foi menor ao longo do estudo e, por conta disso, os animais orquidectomizados apresentaram um peso corporal menor em relação aos demais grupos de animais estudados no dia dos experimentos de reatividade vascular. Isso sugere indiretamente um menor ganho de massa muscular nestes animais e está de acordo com o fato da testosterona ser capaz de produzir efeitos tanto anabolizantes quanto virilizantes (WANG et al., 2000). Vale ressaltar que esta diferença de peso induzida pela

orquidectomia já havia sido por nós observada (ROSSIGNOLI et al., 2010).

Foram realizadas também pesagens dos órgãos sexuais acessórios hormônio-dependentes. 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 et al., 2006; ROSSIGNOLI et al., 2010). Observou-se atrofia induzida pela orquidectomia em vesículas seminais, próstata, epidídimos e ductos deferentes. Esta atrofia foi completamente revertida pela reposição hormonal com testosterona em vesículas seminais, próstata e epidídimos. Esta reversão, contudo, foi apenas parcial no ducto deferente. O fato da reposição hormonal com testosterona reverter a redução do peso dos órgãos sexuais hormônio-dependentes, além de atestar a efetividade do protocolo utilizado, também indica o envolvimento direto da testosterona na atrofia induzida pela orquidectomia. Padrões semelhantes de redução e reversão de peso dos órgãos sexuais acessórios hormônio-dependentes foram verificados em nosso estudo anterior (ROSSIGNOLI et al., 2010), o que também indica a validade e a uniformidade dos procedimentos cirúrgicos e do tratamento hormonal empregado nos animais ao longo de todo o trabalho desenvolvido. Além disso, assim como proposto por Matsuda et al. (1994), a reversão da atrofia dos órgãos sexuais acessórios hormônio-dependentes só ocorre com um protocolo de reposição hormonal com testosterona que induz níveis plasmáticos suprafisiológicos deste hormônio.

Observamos ainda que a orquidectomia induz um significativo aumento do peso das glândulas adrenais, aumento este revertido pela reposição de testosterona. Esta observação já havia sido feita por nós em estudo anterior (ROSSIGNOLI et al., 2010). Um aumento de peso das glândulas adrenais também foi descrito em ratos orquidectomizados por um período de oito semanas (MALENDOWICZ, 1986). Estes dados sugerem um fenômeno adaptativo dessas glândulas frente à orquidectomia. De fato, tem sido descrito em cobaias que baixos níveis de testosterona levam a uma maior ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (BERNICHTEIN et al., 2008). Segundo estes autores, em animais orquidectomizados 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.

Vale ressaltar que a atuação da testosterona sobre os órgãos sexuais acessórios hormônio-dependentes é um parâmetro direto das ações desse hormônio sobre outros órgãos e tecidos. Assim, optou-se por utilizar um esquema de reposição hormonal que revertesse a atrofia dos órgãos sexuais acessórios hormônio-dependentes, ainda que isto produzisse concentrações plasmáticas suprafisiológicas de testosterona. Isto porque, uma vez que o presente estudo objetivava conhecer o impacto das variações de testosterona sobre as respostas dos vasos aos agonistas simpatomiméticos, consideramos que a garantia de efeitos da reposição hormonal com este hormônio sobre os tecidos é mais relevante que a concentração plasmática produzida por este tratamento em si.

Com base nestes resultados confirmamos a efetividade do nosso modelo experimental de orquidectomia, bem como do protocolo de reposição de testosterona utilizado. Isso nos permitiu estabelecer correlações mais claras entre as modificações fisiopatológicas que foram detectadas nos vasos com as alterações drásticas dos níveis circulantes de testosterona impostas pela orquidectomia.

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

No estudo desenvolvido durante mostrado, observou-se que a orquidectomia promove elevação de R_{max} para fenilefrina em veia porta. Isto levou-nos a pensar que a orquidectomia evidencia os efeitos venoconstritores mediados por receptores α -adrenérgicos. Na ocasião, propusemos também que a estimulação concomitante de receptores β -adrenérgicos compensaria o aumento de R_{max} mediado pela estimulação dos receptores α -adrenérgicos. Isto justificaria o fato da orquidectomia não ter induzido modificações nas respostas de veia porta à noradrenalina. Com efeito, este foi considerado um mecanismo fisiológico auto-regulatório que atuaria no sentido de minimizar as alterações hemodinâmicas induzidas por reduções drásticas de testosterona. Este mecanismo compensatório garantiria, desta forma, um adequado retorno venoso nestas situações extremas de variação hormonal.

O fato da orquidectomia influenciar as respostas de veia porta à fenilefrina mas não à noradrenalina permanece sem uma justificativa clara. Visando compreender

melhor este fenômeno, propusemos no presente estudar as respostas contráteis destas preparações à clonidina (agonista α_2 -seletivo) e à metoxamina (agonista α_1 -seletivo que não sofre captação neuronal). O objetivo desta investigação foi verificar se os receptores α_2 -adrenérgicos, bem como, se os mecanismos de captação neuronal de catecolaminas estão envolvidos nas modificações de resposta induzidas pela orquidectomia aos agonistas simpatomiméticos em veia porta. Cabe ressaltar que a noradrenalina apresenta afinidade pelos receptores α_2 -adrenérgicos e sofre captação neuronal. Com efeito, modificações compensatórias nestes mecanismos poderiam justificar o fato da orquidectomia não influenciar as respostas de veias porta à noradrenalina. Os dados obtidos, contudo, mostram que a orquidectomia não promove nenhuma alteração significativa nas respostas de veia porta à clonidina e à metoxamina. Assim, a hipótese da orquidectomia modificar o funcionamento dos receptores α_2 -adrenérgicos, bem como dos mecanismos de captação neuronal fica enfraquecida.

Para estudar de forma mais individualizada os efeitos contráteis da noradrenalina mediados pelos receptores α_1 -adrenérgicos na veia porta, incubamos estas preparações com timolol (antagonista não seletivo de receptores β -adrenérgicos) isoladamente ou associado à ioimbina (antagonista seletivo de receptores α_2 -adrenérgicos). Também nestas condições, contrariando as nossas expectativas, nenhuma modificação de resposta à noradrenalina induzida pela orquidectomia foi observada. Assim, a hipótese anteriormente aventada de que a estimulação concomitante de receptores β -adrenérgicos compensaria o aumento de R_{max} mediado pela estimulação dos receptores α_1 -adrenérgicos, que justificaria o fato da orquidectomia elevar o R_{max} para fenilefrina mas não para a fenilefrina na veia porta, fica bastante enfraquecida.

Questionamos inicialmente a eficácia dos antagonistas utilizados nestes experimentos. Contudo, testes foram realizados antes do início dos experimentos de reatividade vascular e a atividade do timolol foi confirmada através do bloqueio do relaxamento induzido por isoproterenol em anel de aorta isolada de rato (SCRIABINE et al., 1973). Paralelamente, a atividade da ioimbina foi confirmada através do bloqueio da contração de veia porta isolada de rato induzida pela clonidina (SHIMAMURA et al., 2006). Com base nisto, nossa atenção mais uma vez aos receptores α_1 -adrenérgicos.

A literatura relata a existência de três subtipos de receptores α -adrenérgicos em veia porta de rato, descritos como α_{1H} , α_{1L} e α_{1N} (SAYET et al., 1993). Sugere-se ainda que as respostas induzidas pela noradrenalina em veia porta envolvam preferencialmente receptores α_{1L} , cujas características assemelham-se ao receptores α_{1A} (DOCHERTY, 1998; CALZADA et al., 2001), e receptores α_{1N} . A literatura, entretanto, é escassa de informações a respeito dos efeitos da orquidectomia sobre a expressão destes diferentes subtipos de receptores adrenérgicos em veia porta isolada de rato. Em aorta de ratos, tem sido relatada a ocorrência de plasticidade nos subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos em aorta de rato, onde a orquidectomia faz com que os receptores α_{1A} -adrenérgicos passem a colaborar com os receptores α_{1D} -adrenérgicos na resposta frente à noradrenalina (MORAIS et al., 2003). É delicado transpor estes conhecimentos obtidos em aorta, contudo não podemos descartar a hipótese de que um fenômeno semelhante de plasticidade possa estar ocorrendo em veia porta após a orquidectomia. Isto poderia justificar ao menos parcialmente as diferenças de resposta observadas entre fenilefrina e noradrenalina na veia porta após a orquidectomia. Ou seja, é possível que a orquidectomia induza uma maior ativação de algum subtipo específico de receptor que medeia preferencialmente as respostas contráteis em veia porta à fenilefrina. No entanto, como a literatura não traz relatos a cerca dos subtipos de receptores adrenérgicos envolvidos na resposta frente à fenilefrina em veia porta de rato, futuras investigações se fazem necessárias para confirmação desta hipótese.

Por outro lado, temos observado também que a noradrenalina promove contrações mais vigorosas em veia porta de rato, comparadas às contrações induzidas pela fenilefrina. Assim, é possível que noradrenalina mobilize toda a capacidade contrátil nessa preparação e, desta forma, a orquidectomia não disponha de margem para elevar as respostas de veia porta a este agonista. As respostas à fenilefrina, por sua vez, poderiam ainda ser elevadas pela orquidectomia uma vez que em condições fisiológicas estas não atingem o limite contrátil desse tecido vascular. Esta hipótese é plausível, contudo, não explica o fato da orquidectomia falhar em modificar as respostas da veia porta à metoxamina, agonista que também promove contrações menores em relação à noradrenalina. Dessa forma, uma investigação mais refinada, empregando outros agonistas simpatomiméticos faz-se necessária para que esta hipótese seja confirmada ou

descartada.

No mestrado investigamos a participação de mecanismos endoteliais e/ou sub-endoteliais, relacionados ao NO, aos prostanóides e à endotelina-1, no aumento de R_{max} para fenilefrina em veia porta isolada de rato induzido pela orquidectomia. Neste estudo, a participação do NO e dos prostanóides foi descartada nas modificações de resposta de veia porta à fenilefrina. Contudo, o referido aumento de resposta da veia porta à fenilefrina induzido pela orquidectomia, foi inibido na presença de inibidores seletivos de receptores para endotelina-1, tanto ET_A quanto ET_B (ROSSIGNOLI et al., 2010). Os resultados obtidos no mestrado indicaram que a endotelina-1, através da ação em receptores ET_A e ET_B , medeia o aumento de R_{max} frente à fenilefrina em veia porta isolada de animais orquidectomizados. Dessa forma, outro foco de interesse do presente estudo foi descrever de forma mais detalhada os mecanismos locais envolvidos nas modificações de resposta da veia porta à fenilefrina induzidas pela orquidectomia.

Para isto, fizemos primeiramente curvas concentração-resposta à endotelina-1 em preparações de veias portas obtidas de animais controles e submetidos à orquidectomia. Esta investigação foi realizada para determinar se a capacidade de resposta destas preparações de veia porta à endotelina-1 era modificada pela orquidectomia. Caso isto fosse constatado, a endotelina-1 liberada pela ação da fenilefrina teria suas respostas intensificadas nos animais orquidectomizados. Os resultados obtidos, contudo, mostraram que a orquidectomia não modifica a reatividade de veia porta à endotelina-1.

Como a orquidectomia não modifica a capacidade de resposta da veia porta à endotelina-1, inferiu-se que esta pode levar a um aumento na produção local deste peptídeo. Para testar esta hipótese, estudou-se a expressão local de mRNA para endotelina-1 e para os receptores ET_A e ET_B de endotelina-1 em veia porta isolada tanto de ratos controles quanto de orquidectomizados seguido ou não de reposição com testosterona. Os dados obtidos mostram que a orquidectomia promove um aumento na expressão de endotelina-1 em veia porta isolada de rato. Isto sugere que reduções drásticas nos níveis plasmáticos de testosterona estimulam a expressão local de endotelina-1. Além disso, a reposição hormonal com testosterona foi capaz de reverter este aumento na expressão de endotelina-1, o que confirma o envolvimento da testosterona neste fenômeno. Neste sentido, os dados obtidos no

presente trabalho fundamentam a hipótese aventada anteriormente de que a orquidectomia aumenta a expressão local de endotelina-1, que por sua vez pode estar envolvida no aumento de reatividade de veia porta á fenilefrina. Esta hipótese é corroborada por estudos anteriores que sugerem que a produção local de endotelina-1 potencializa os efeitos vasculares de agonistas de receptores adrenérgicos α_1 (HENRION & LAHER, 1993; THORIN et al., 1998).

Por outro lado, a orquidectomia não modificou significativamente a expressão local de receptores ET_A em veia porta. Em contrapartida, a expressão de receptores ET_B foi aumentada em decorrência da orquidectomia, sendo revertida pela reposição hormonal com testosterona. Neste sentido, muito embora a expressão dos receptores ET_B esteja aumentada em veia porta, isto não implicou em alterações da reatividade destas preparações à endotelina-1 exógena. Cabe ressaltar que não foi possível quantificar a expressão de receptores ET_B no endotélio e na musculatura lisa vascular, distintamente. Assim, é possível que os receptores ET_B presentes no endotélio dos animais orquidectomizados, promovendo liberação de mediadores relaxantes como o óxido nítrico, prostaciclina e fator hiperpolarizante (MAZZUCA & KHALIL, 2012), contrabalançam os efeitos contráteis mediados por receptores ET_B superexpressos nas células musculares lisas.

O estudo apresentado amplia a discussão a respeito dos efeitos da testosterona sobre o funcionamento dos mecanismos vasculares relacionados à endotelina-1. Na verdade, nossos resultados contrariam alguns relatos de literatura, nos quais sugere-se que a testosterona plasmática eleva os níveis de endotelina-1 (POLDERMAN et al., 1993) ou big-endotelina-1 (VAN KESTEREN et al., 1998) em seres humanos. Também contrariam dados obtidos a partir de culturas de células endoteliais humanas, nas quais foi demonstrado que a testosterona aumenta a percentagem de células que secretam endotelina-1, bem como a expressão de mRNA para endotelina-1 nessas células (PEARSON et al., 2008).

Por outro lado, os resultados do presente trabalho assemelham-se a relatos da literatura que evidenciam a influência da orquidectomia sobre os mecanismos relacionados à endotelina-1 em órgãos sexuais acessórios hormônio-dependentes. Em próstata de rato, a orquidectomia aumentou a expressão de endotelina-1 e de receptores ET_B na porção dorsolateral e ventral e reduziu a expressão de receptores ET_A na porção dorsolateral (TAKAHASHI et al., 2002). Em cães, a orquidectomia

aumentou a ligação de endotelina-1 na próstata, enquanto reduziu a ligação de endotelina-1 no cérebro (PADLEY et al., 2002). Além disso, a orquidectomia induziu um aumento na expressão de endotelina-1, bem como de receptores ET_A e ET_B, em vesícula seminal de rato (TAKAHASHI et al., 2003). Em epidídimo de rato, a endotelina-1 também foi superexpressa em decorrência da orquidectomia (HAMZEH & ROBAIRE, 2010). Juntos, estes dados indicam que a testosterona pode aumentar a expressão de endotelina-1 e receptores ET_B nestes órgãos sexuais acessórios hormônio-dependentes, fenômeno que ocorre também em veia porta de rato.

Como já foi mencionado, o presente estudo foi proposto com base em evidências de que as repercussões da orquidectomia sobre as respostas de leitos venosos aos agonistas simpatomiméticos são território-específicas. De fato, já sabíamos que a orquidectomia aumenta o R_{max} para fenilefrina em preparações de veia porta sem causar modificações desse parâmetro em veia cava de ratos (ROSSIGNOLI et al., 2010). Por conta disso, analisou-se também os efeitos da orquidectomia, seguida ou não de reposição hormonal com testosterona, em outros leitos venosos. Com efeito, corroborando a característica território-específica da orquidectomia, observamos que esta não modificou significativamente o padrão de resposta de veias pulmonar, renal, femoral e mesentérica frente à fenilefrina.

Estes resultados nos parecem interessantes uma vez que a venoconstrição ativa do território esplâncnico, território este descrito por Kjekshus et al. (2000) como sendo o maior reservatório de sangue no organismo, pode ser de extrema importância em situações que envolvem redistribuição do fluxo sanguíneo com conseqüente aumento do débito cardíaco, tais como o exercício e as modificações posturais (HAINSWORTH & DRINKHILL, 2006; ROTHE, 2006). Neste sentido, é possível que a orquidectomia limite o fluxo sanguíneo através da veia porta através da venoconstrição deste leito venoso. Muito embora a veia mesentérica participe de maneira significativa da mobilização do conteúdo sanguíneo no território esplâncnico (HAMZA & KAUFMAN, 2011), não foram observadas alterações de reatividade frente à fenilefrina em veia mesentérica. Esta ausência de alterações de resposta de veia mesentérica à fenilefrina pode significar um mecanismo protetor no território esplâncnico, a fim de evitar uma elevação muito intensa e descontrolada da pressão neste território nas situações de redistribuição de fluxo sanguíneo.

Com base no fato da orquidectomia promover modificações agonista-

específicas na reatividade de leitos vasculares, propôs-se também estudar as ações venoconstritoras destes leitos venosos a outros agonistas simpatomiméticos como noradrenalina, clonidina e metoxamina. Contudo, a exemplo daquilo que foi observado com a fenilefrina, a orquidectomia seguida ou não por reposição com testosterona não modificou as ações vasomotoras destes agonistas em nenhum dos leitos venosos estudados. Isto corrobora mais uma vez a característica território-específica do fenômeno investigado.

O fato da orquidectomia não modificar significativamente as respostas vasomotoras aos agonistas estudados não exclui por completo a hipótese de que estas drásticas reduções de testosterona tenham impacto na fisiologia destes leitos vasculares. A investigação da participação de mecanismos endoteliais e/ou sub-endoteliais estava prevista apenas em leitos onde fossem detectadas modificações de reatividade induzida pela orquidectomia. Contudo, dados obtidos em outros estudos do laboratório indicam que modificações de respostas em leitos venosos podem ser ocultadas pela ação de substâncias moduladores produzidas localmente, como NO e prostanóides. Assim, optamos por realizar os experimentos na presença de L-NAME ou L-NAME + INDO, respectivos bloqueadores não seletivos de óxido NOS e COX mesmo em preparações onde a orquidectomia falhou em modificar as respostas aos agonistas investigados. Os resultados obtidos, no entanto, mostram que a orquidectomia não promove modificações de resposta aos agonistas simpatomiméticos em nenhuma das preparações estudadas, mesmo na presença destes bloqueadores (Anexo 1).

Os mecanismos que determinam esta característica território-específica do fenômeno investigado ainda são desconhecidos e certamente motivarão futuros estudos. A literatura menciona que reatividade venosa pode ser modulada por mediadores produzidos no tecido adiposo perivascular. Neste sentido, observou-se que o tecido adiposo perivascular atenua a contração induzida por agonistas na veia cava inferior através da liberação de angiotensina-(1-7), que promove a liberação local de óxido nítrico (NO acertar abreviações) e ativa canais de potássio regulados por voltagem (LU et al., 2011). Vale ressaltar que, dentre todos os leitos venosos estudados até o presente momento, a veia porta é o que possui a menor quantidade de tecido adiposo perivascular. Dessa forma, é possível que a não observação de modificações de reatividade induzidas pela orquidectomia em veias pulmonar, renal,

femoral e mesentérica seja decorrente da atuação do tecido adiposo perivascular no sentido de ocultar as modificações de respostas vasomotoras frente aos agonistas simpatomiméticos estudados. Se isto for verdade, estes tecidos adiposos perivascular atuariam através da liberação de mediadores não relacionados à NOS ou à COX.

A fim de ampliar o presente estudo, visando uma idéia mais abrangente da território-especificidade do fenômeno estudado, este foi complementado pela investigação dos efeitos da orquidectomia sobre a reatividade de artérias pulmonar, femoral, mesentérica, aorta torácica e aorta abdominal à agonistas simpatomiméticos. A escolha destes leitos arteriais teve um propósito específico uma vez que apresentam papéis fisiológicos correspondentes aqueles desempenhados pelos leitos venosos até então estudados. Com efeito, estes leitos arteriais atuam em conjunto com as veias estudadas para propiciar uma adequada irrigação sanguínea nos diferentes territórios/órgãos. É pertinente esclarecer contudo que, para esta investigação da reatividade destes leitos arteriais, por ser uma etapa não prevista no projeto inicial, foram utilizados apenas desafios com noradrenalina e fenilefrina.

Os dados obtidos nestes experimentos mostram que a orquidectomia aumentou a reatividade de artéria femoral à fenilefrina, mas não à noradrenalina, aumento este que não foi revertido após a reposição hormonal com testosterona. Como foi mencionado anteriormente, é aceito na literatura que, caso as alterações fisiopatológicas induzidas pela orquidectomia sejam revertidas pela reposição de testosterona, estas provavelmente são testosterona-dependentes. Com base nisto, é plausível afirmar que as modificações de resposta da artéria femoral à fenilefrina, observadas no presente estudo em decorrência da orquidectomia, provavelmente não estão relacionadas à diminuição dos níveis plasmáticos de testosterona. Os mecanismos envolvidos nesta modificação de resposta vascular aparentemente não dependente de testosterona, entretanto, ainda não estão suficientemente claros.

Por outro lado, foi o tratamento com testosterona, e não a sua privação através da orquidectomia, o responsável por aumentar a reatividade de aorta abdominal à fenilefrina e à noradrenalina. Isso sugere fortemente que os níveis suprafisiológicos de testosterona, alcançados com a reposição hormonal, tenham ocasionado este aumento de resposta de aorta abdominal frente à fenilefrina e

noradrenalina. Esta hipótese é corroborada por relatos da literatura que mostram aumento da resposta vasoconstritora de artérias de resistência de homens com hipogonadismo à noradrenalina após reposição hormonal com testosterona (MALKIN et al., 2006).

Em artérias pulmonar, mesentérica e aorta torácica observamos que a orquidectomia, seguida ou não de reposição hormonal com testosterona, não promoveu alterações significativas de reatividade frente à fenilefrina e à noradrenalina. Isto também está de acordo com relatos na literatura, uma vez que a orquidectomia também não modificou significativamente as respostas vasomotoras de aortas isoladas de rato à noradrenalina (MATSUDA et al., 1994; WANG et al., 2002).

Por fim, esta investigação complementar realizada em artérias trouxe contribuições importantes ao presente estudo pois reforça a território-especificidade do fenômeno estudado. Desta forma, a compreensão do impacto da orquidectomia, seguida ou não de reposição hormonal com testosterona, sobre o sistema cardiovascular foi ampliada. Além disso, os dados obtidos reforçam a complexidade deste assunto, o que é corroborado pelos conflitos de informações acerca do impacto das variações hormonais sobre a reatividade de artérias aos agonistas simpatomiméticos que existem na literatura.

Conclusões

- As modificações de resposta aos agonistas simpatomiméticos induzidas pela orquidectomia em veia porta são agonista-específicas e parece não haver o envolvimento de receptores α_2 e β -adrenérgicos, bem como dos mecanismos de captação neuronal de catecolaminas;
- A orquidectomia promove um aumento da expressão de endotelina-1 em veia porta que é revertido pela reposição hormonal com testosterona. Este fenômeno pode estar relacionado ao já observado aumento das respostas deste leito venoso à fenilefrina;
- A orquidectomia não altera o padrão de reatividade de veias pulmonar, renal, femoral e mesentérica isoladas de rato, frente à fenilefrina, noradrenalina, clonidina e à metoxamina, o que indica a território-especificidade do fenômeno observado;
- A orquidectomia induz um aumento de resposta máxima da artéria femoral à fenilefrina provavelmente por meio de mecanismos não dependentes de testosterona;
- É possível que os níveis séricos suprafisiológicos de testosterona resultantes do protocolo de reposição hormonal utilizado tenha promovido aumento da respostas da aorta abdominal tanto à fenilefrina quanto à noradrenalina.

Referências

ABDEL-SAYED, W.A.; ABOUD, 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.

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. **Br. J. Pharmac. Chemother.**, v.31, n.1, p.26-31, 1967.

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, v.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.

BRONQUARD, C.; MAUPOIL, V.; ARBEILLE, B.; FETISSOF, F.; FINDLAY, I.; COSNAY, P.; FRESLON, J.L. Contractile and relaxant properties of rat-isolated pulmonary veins related to localization and histology. **Fund. Clin. Pharmacol.**, v.21, n.1, p.55-65, 2007.

CALZADA, B.C.; ARTIÑANO, A.A. Alpha-adrenocpetor subtypes. **Pharmacol. Res.**, v.44, n.3, p.195-208, 2001.

del CAMPO, L.; SAGREDO, A.; ARAS-LÓPEZ, R.; BALFAGÓN, G.; FERRER, M. Orchidectomy increases the formation of non-endothelial thromboxane A₂ and modulates its role in the electrical field stimulation-induced response in rat mesenteric artery. **J. Endocrinol.**, v.197, n.2, p.371-379, 2008.

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.

CHEUK, B.L.; LUNG, P.S.; LO, A.C.; WONG, P.Y. Androgen control of cyclooxygenase expression in the rat epididymis. **Biol. Reprod.**, v.63, n.3, p.775-780, 2000.

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.

DAVID, F.L.; MONTEZANOL, A.C.I.; REBOUÇAS, N.A.; NIGRO, D.; FORTES, Z.B., CARVALHO, M.H.C.; TOSTES, R.C.A. Gender differences in vascular expression of endothelin and ET_A/ET_B receptors, but not in calcium handling mechanisms, in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. **Br. J. Med. Biol. Res.**, v.35, n.9, p.1061-1068, 2002.

DELP, M.D.; O'LEARY, D.S. Integrative control of the skeletal muscle microcirculation in the maintenance of arterial pressure during exercise. **J. Appl. Physiol.**, v.97, n.1, p.1112-1118, 2004.

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.

DOCHERTY, J.R. Subtypes of functional α_1 - and α_2 -adrenoceptors. **Eur. J. Pharmacol.**, v.361, n.1, p.1-15, 1998.

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.

DUNCKER, D.J.; BACHE, R.J. Regulation of coronary blood flow during exercise. **Physiol. Rev.**, v.88, n.1, p.1009-1086, 2008.

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.

FLAMM, S.D.; TAKI, J.; MOORE, R.; LEWIS, S.F.; KEECH, F.; MALTAIS, F.; AHMAD, M.; CALLAHAN, R.; DRAGOTAKES, S.; ALPERT, N.; STRAUS, H.W. Redistribution of regional and organ blood volume and effect on cardiac function in relation to upright exercise intensity in healthy human subjects. **Circulation**, v.81, n.5, p.1550-1559, 1990.

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.

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.

GUO, J; JIA, Y; TAO, S; LI, Y; ZHANG, X; HU, Z; CHIANG, N; LUE, Y.H.; HIKIM, A.P.; SWERDLOFF, R.S.; WANG, C; LIU, Y.X. Expression of nitric oxide synthase during germ cell apoptosis in testis of cynomolgus monkey after testosterone and heat treatment. **J. Androl.**, v.30, n.2, p.190-199, 2009.

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.1, p.1264–1265, 2006.

HAMZA, S.M.; KAUFMAN, S. Splenic neurohormonal modulation of mesenteric vascular tone. **Exp. Physiol.**, [Epub ahead of print], 2011.

HAMZEH, M.; ROBAIRE, B. Identification of early response genes and pathway activated by androgens in the initial segment and caput regions of the regressed rat epididymis. **Endocrinology**, v.151, n.9, p.4504-4514, 2010.

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.

HENRION, D.; LAHER, I. Potentiation of norepinephrine-induced contractions by endothelin-1 in the rabbit aorta. **Hypertension**, v.22, n.1, p.78-83, 1993.

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.

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

ITO, T.; CHOBA, S. Vascular Responsiveness of isolated and perfused simian metacarpal veins to several vasoconstrictor substances. **Japan. J. Pharmacol.**, v.44, n.1, p.358-360, 1987.

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.

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.

KAPOOR, D.; JONES, T.H. Androgen deficiency as a predictor of metabolic syndrome in aging men: an opportunity for intervention? **Drugs Aging**, v.25, n.5, p.357-369, 2008.

KEEN, J.A.; HILLIER, C.; MCGORUM, B.C.; NALLY, J.E. Endothelin mediated contraction of equine laminar veins. **Equine Vet. J.**, v.40, n.5, p.488-492, 2008.

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.

KINTZEL, P.E.; CHASE, S.L.; SCHULTZ, L.M.; O'ROURKE, T.J. Increased risk of metabolic syndrome, diabetes mellitus, and cardiovascular disease in men receiving androgen deprivation therapy for prostate cancer. **Pharmacotherapy**, v.28, n.12, p.1511-1522, 2008.

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.H1796-1803, 2000.

KOÇER, G.; KURU, O.; GÜNDÜZ, F.; OZDEM, S.; AKSOV, D.; SENTÜRK, U.K. The effect of exercise training on the responsiveness of renal resistance arteries in rats. **Ren. Fail.**, v.33, n.6, p.587-592, 2011.

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 endothelin-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.

LU, C.; ZHAO, A.X.; GAO, Y.J.; LEE, R.M.K.W. Modulation of vein function by perivascular adipose tissue. **Eur. J. Pharmacol.**, v.657, n.1, p.111-116, 2011.

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.

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.

MANSART, A.; RUFF, L.J.; ARIAANS, M.P.; REILLY, C.S.; BROWN, N.J.; KAUFMAN, S.; BROOKES, Z.L. Constriction of rat extra-splenic veins to lipopolysaccharide involves endothelin-1. **Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v.381, n.6, p.555-562, 2010.

MARTORELL, A.; BLANCO-RIVERO, J.; ARAS-LÓPEZ, R.; SAGREDO, A.; BALFAGÓN, G.; FERRER, M. Orchidectomy increases the formation of prostanoids and modulates their role in the acetylcholine-induced relaxation in the rat aorta. **Cardiovasc. Res.**, v.77, n.3, p.590-599, 2008.

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.

MAZZUCA, M.Q.; KHALIL, R.A. Vascular endothelin receptor type B: Structure, function and dysregulation in vascular disease. **Biochem. Pharmacol.**, [Epub ahead of print], 2012.

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.

MILDENBERGER, E.; BIESEL, B.; SIEGEL, G.; VERSMOLD, H.T. Endothelin B receptors on vascular smooth muscle cells of the human umbilical vein mediated vasoconstriction. **Fetal Diagn. Ther.**, v.24, n.1, p.67-70, 2008.

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.

MOLLY, M.S.; SMITH, N.L.; FORSBERG, C.W.; ANAWALT, B.D.; MATSUMOTO, A.M. Testosterone treatment and mortality in men with low testosterone levels. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.97, n.6, p.2050-2058, 2012.

MORAIS, P.L.; CAMPOS, M.; PUPO, A.S. Effects of castration on α_1 -adrenocpetor subtypes in the rat aorta. **Vasc. Pharmacol.**, v.39, n.1, p.335-341, 2003.

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.

MUSCH, T.I.; FRIEDMAN, D.B.; PITETTI, K.H.; HAIDET, G.C.; STRAY-GUNDERSEN, J.; MITCHELL, J.H.; ORDWAY, G.A. Regional distribution of blood

flow of dogs during graded dynamic exercise. **J. Appl. Physiol.**, v.63, n.6, p.2269-2277, 1987a.

MUSCH, T.I.; HAIDET, G.C.; ORDWAY, G.A.; LONGHURST, J.C.; MITCHELL, J.H. Training effects on regional blood flow response to maximal exercise in foxhounds. **J. Appl. Physiol.**, v.62, n.4, p.1724-1732, 1987b.

NETTLESHIP, J.E.; JONES, R.D.; CHANNER, K.S.; JONES, T.H. Testosterone and coronary artery disease. **Front. Horm. Res.**, v.37, n.1, p.91-107, 2009.

OLOYO, A.K.; SOFOLA, O.A.; ANIGBOGU, C.N. Orchidectomy attenuates impaired endothelial effects of a high-salt diet in Sprague-Dawley rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v.89, n.1, p.295-304, 2011.

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.

PADLEY, R.J.; DIXON, D.B.; WU-WONG, J.R. Effect of castration on endothelin receptors. **Clin. Sci. (London)**, v.103, suppl.48, p.442S-445S, 2002.

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.

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.

ROSSIGNOLI, P.S.; PEREIRA, O.C.M.; CHIES, A.B. Orchidectomy enhances the effects of phenylephrine in rat isolated portal vein. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v.37, n.3, p.368-374, 2010.

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 endothelin-1 in genesis of coronary artery disease. **Indian Heart J.**, v.57, n.2, p.121-127, 2005.

SAYET, I.; NEUILLY, G.; RAKOTOARISOA, L.; MIRONNEAU, C.; MIRONNEAU, J. Relation between α_1 -adrenoceptor subtypes and noradrenaline-induced contraction in rat portal vein smooth muscle. **Br. J. Pharmacol.**, v.110, n.1, p.207-212, 1993.

SCHROR, K.; MORINELLI, T.A.; MASUDA, A.; MATSUDA, K.; MATHUR, R.S.; HALUSHKA, P.V. Testosterone treatment enhances thromboxane A_2 mimetic induced coronary artery vasoconstriction in guinea pigs. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 24, suppl 1, p.50-52, 1994.

SCRIABINE, A.; TORCHIANA, M.L.; STAVORSKI, J.M.; LUDDEN, C.T.; MINSKER, D.H.; STONE, C.A. Some cardiovascular effects of timolol a new beta-adrenergic blocking agent. **Arch Int Pharmacodyn Ther.**, v.205, n.1, p.76-93, 1973.

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

SHEN, Z; CHEN, Z; LU, Y; CHEN, F; CHEN, Z. Relationship between gene expression of nitric oxide synthase and androgens in rat corpus cavernosum. **Chin. Med. J. (Engl.)**, v.113, n.12, p.1092-1095, 2000.

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.H316-22, 1993.

SHERIFF D. Point: The muscle pump raises muscle blood flow during locomotion. **J Appl Physiol.**, v.99, n.1, p.371-372, 2005.

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.

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

SUDHIR, K.; SMOLICH, J.J.; ANGUS, J.A. Venous reactivity in canine renovascular hypertension. **Clin. Exp. Hypertens. A.**, v.12, n.4, p.507-531, 1990.

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

TAKAHASHI, W.; AFIATPOUR, P.; FOSTER, H.E.; IKEDA, K.; WADA, Y.; WEISS, R.M.; LATIFPOUR, J. The effect of castration on endothelins, their receptors and endothelin converting enzyme in rat prostate. **Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.**, v.366, n.2, p.166-176, 2002.

TAKAHASHI, W.; YONO, M.; WADA, Y.; IKEDA, K.; WEISS, R.M.; LATIFPOUR, J. Regulatory effect of castration on endothelin, their receptors and endothelin-converting enzyme in rat seminal vesicle. **BJU. Int.**, v.93, n.7, p.803-809, 2003.

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, 2000.

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.

THORIN, E.; CERNACEK, P.; DUPUIS, J. Endothelin-1 regulates tone of isolated small arteries in the rat: effect of hyperendothelinemia. **Hypertension**, v.31, n.4, p.1035-1041, 1998.

TIRAPELLI, C.R.; CASOLARI, D.A.; OGI, A.; MONTEZANO, A.C.; TOSTES, R.C.; LEGROS, E.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; OLIVEIRA, A.M. Functional characterization and expression of endothelin receptors in rat carotid artery: involvement of nitric oxide, a vasodilator prostanoid and the opening of K^+ channels in ET_B -induced relaxation. **Br. J. Pharmacol.**, v.146, n.6, p.903-912, 2005.

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.

UDYAVAR, A.R.; CHEN, Y.C.; CHEN, Y.J.; CHENG, C.C.; LIN, C.I.; CHEN, S.A. Endothelin-1 modulates the arrhythmogenic activity of pulmonary veins. **J. Cardiovasc. Electrophysiol.**, v.19, n.3, p.285-292, 2008.

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.

van der VELDEN, V.H.; HOCHHAUS, A.; CAZZANIGA, G.; SZCZEPANSKI, T.; GABERT, J.; VAN DONGEN, J.J. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. **Leukemia**, v.17, n.1, p.1013-1034, 2003.

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.

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.

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.

ZHOU, P.; FY, L.; PAN, Z.; MA, D.; ZHANG, Y.; QU, F.; GUO, L.; CAO, J.; GAO, Q.; HAN, Y. Testosterone deprivation by castration impairs expression of voltage-dependent potassium channels in rat aorta. **Eur. J. Pharmacol.**, v.593, n.1. p.87-91, 2008.

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.

Anexo

Anexo 1 – Estudos complementares acerca da participação de mecanismos relacionados ao NO e aos prostanóides nas respostas vasomotoras de veias pulmonar, renal e femoral frente aos agonistas simpatomiméticos estudados

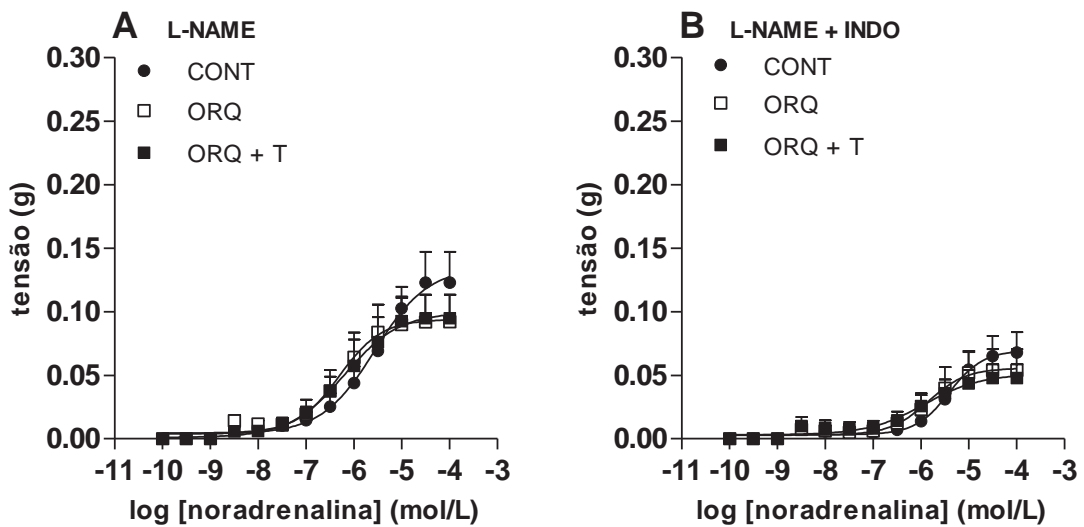


Figura 1- Curvas concentração-resposta para noradrenalina obtidas de preparações de veia pulmonar isoladas de animais controles (CONT; ●), orquidectomizados (ORQ; □) e orquidectomizados submetidos à reposição com testosterona (ORQ+T; ■), previamente incubadas com L-NAME 10^{-4} M (A) e L-NAME 10^{-4} M + INDO 10^{-5} M (B). (n = 8-10).

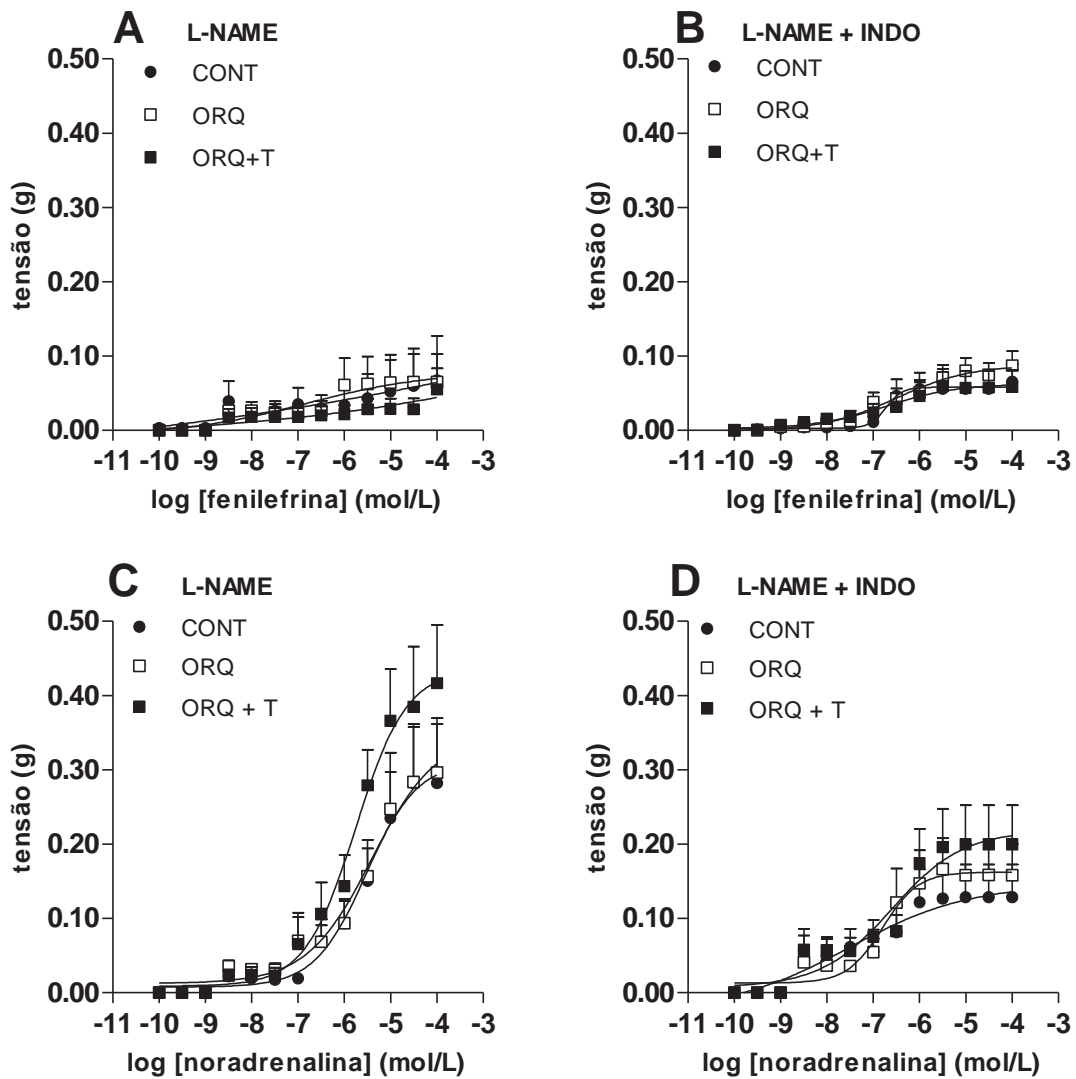


Figura 2- Curvas concentração-resposta para fenilefrina (A, B) e noradrenalina (C, D) obtidas de preparações de veia renal isoladas de animais controles (CONT; ●), orquidectomizados (ORQ; □) e orquidectomizados submetidos à reposição com testosterona (ORQ+T; ■), previamente incubadas com L-NAME 10^{-4} M (A, C) e L-NAME 10^{-4} M + INDO 10^{-5} M (B, D) (n = 8-10).

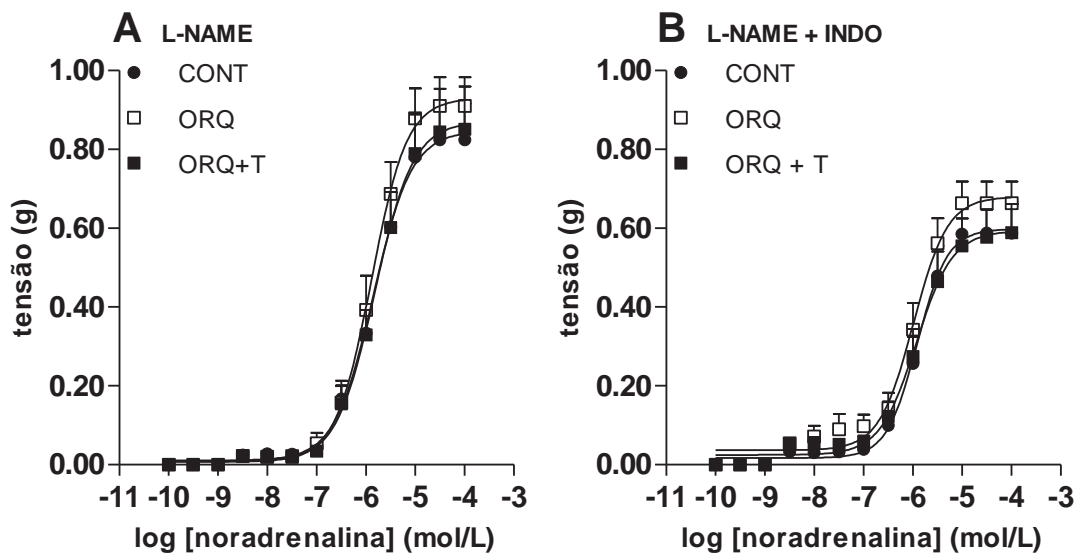


Figura 3- Curvas concentração-resposta para noradrenalina obtidas de preparações de veia femoral isoladas de animais controles (CONT; ●), orquidectomizados (ORQ; □) e orquidectomizados submetidos à reposição com testosterona (ORQ+T; ■), previamente incubadas com L-NAME 10^{-4} M (A) e L-NAME 10^{-4} M + INDO 10^{-5} M (B). Valores apresentados em média \pm E.P.M. (n = 8-10).