

UNIVERSIDADE VILA VELHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**INFLUÊNCIA DOS NÍVEIS DE TESTOSTERONA SOBRE O REFLEXO
CARDIOPULMONAR E ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA
EM RATOS**

OTÁVIO ARRUDA HERINGER

VILA VELHA-ES
MARÇO/2014

UNIVERSIDADE VILA VELHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**INFLUÊNCIA DOS NÍVEIS DE TESTOSTERONA SOBRE O REFLEXO
CARDIOPULMONAR E ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA
EM RATOS**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade.

VILA VELHA-ES
MARÇO/2014

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

H546i Heringer, Otávio Arruda.

Influência dos níveis de testosterona sobre o reflexo cardiopulmonar e enzima conversora de angiotensina em ratos / Otávio Arruda Heringer. – 2014.

30 f.: il.

Orientador: Tadeu Uggere de Andrade.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2014.

Inclui bibliografias.

1. Rato. 2. Sistema cardiopulmonar. 3. Testosterona. 4. Enzima conversora da angiotensina. I. Andrade, Tadeu Uggere de. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 636.089612

OTÁVIO ARRUDA HERINGER

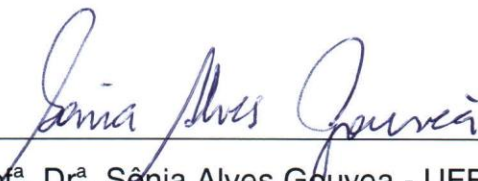
**INFLUÊNCIA DOS NÍVEIS DE TESTOSTERONA SOBRE O REFLEXO
CARDIOPULMONAR E ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA
EM RATOS**

Dissertação apresentada à Universidade
Vila Velha como pré-requisito do
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas para obtenção
do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Tadeu Uggere de
Andrade.

Aprovada em 12 de Março de 2014,

Banca Examinadora:



Prof.^a. Dr.^a. Sônia Alves Gouveia - UFES



Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez - UVV



Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade – UVV
(Orientador)

“Tente. Fracasse. Não importa. Tente outra vez. Fracasse outra vez. Fracasse melhor.”

Samuel Beckett

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de viver.

À minha amada esposa, por tornar tudo digno e valioso, e sem a qual não teria chegado a lugar algum.

À minha mãe pelo amor incondicional e ao Márcio Belém pela figura paterna e sua integridade.

À minha irmã, Jeferson e Pedro.

A todos os meus amigos os quais tive que por muitas vezes abrir mão da presença.

Ao meu orientador, que nunca deixou de acreditar em mim, sendo acima de tudo um grande amigo.

A todos os meus companheiros de mestrado pela vivência e aprendizado. À Didley Caselli pelo apoio e confiança.

Aos amigos e colegas da Tommasi Analítica. Em especial à Joice Tozetti que por muitas vezes me ajudou com os experimentos e ao Bruno Tommasi pela oportunidade.

A todos os professores que foram fundamentais em minha formação profissional: Alessandra Tesch, Denise Endringer, Fernando Barcelos, João Vicente Franquini, Iêda Kalil, June Maia e Rodrigo Scherer.

Aos colegas Andrews do Nascimento e Girlândia Brasil pela grande colaboração a este trabalho.

À Universidade Vila Velha pela oportunidade concedida.

A todos as pessoas que não citei e que de alguma forma ajudaram e me apoiaram.

RESUMO

HERINGER, Otávio Arruda. MSc. em Ciências Farmacêuticas, Universidade Vila Velha-ES, Março de 2014, **Influência dos níveis de testosterona sobre o reflexo cardiopulmonar e enzima conversora de angiotensina em ratos**. Orientador: Tadeu Uggere de Andrade.

O papel dos andrógenos no controle da pressão arterial em homens, especialmente com o aumento da idade, não é claro. Dentre os diversos mecanismos de controle do sistema cardiovascular, destacam-se os reflexos cardiovasculares, tais como o Reflexo Bezold-Jarisch (RBJ), e o Sistema Renina-Angiotensina (SRA). Relação entre o SRA e RBJ tem sido reportada onde é observado efeito positivo do SRA sobre o funcionamento do RBJ. Adicionalmente, relação entre androgênios, RBJ e SRA já reportada, indicando que o prejuízo do RBJ induzido por doses supra-fisiológicas de análogos de androgênios ocorre, pelo menos em parte, pela influência do SRA. Entretanto, a relação entre os níveis fisiológicos de testosterona sobre o RBJ e o SRA ainda não foi estudada. O objetivo do estudo foi o de determinar a influência da castração de ratos sobre o funcionamento do reflexo cardiopulmonar (Bezold-Jarisch), parâmetros morfométricos cardíacos e atividade da ECA plasmática e cardíaca. Neste experimento os animais foram divididos em grupo SHAM, ratos submetidos à cirurgia fictícia, CAS24H, CAS72H, CAS7D e CAS21D constituídos de ratos castrados com tempos após castração de 24 e 72 horas, e 7 e 21 dias, respectivamente. Avaliou-se o RBJ pelas quedas máximas na frequência cardíaca (FC) e pressão arterial diastólica (PAD), induzidas por doses crescentes de fenilbiguanida (FBG 1,5 - 24 µg/kg), a atividade da ECA cardíaca e plasmática pela clivagem de Hip-Gli-Gli, e os parâmetros morfométricos: núcleos por campo, perímetro nuclear e relação peso coração e peso corporal. Não foram observadas alterações morfológicas nos grupos submetidos à castração em relação ao grupo SHAM. Observou-se redução nos níveis de testosterona a partir de 24 horas de castração atingindo o menor valor após 21 dias (SHAM: $2,387 \pm 0,151$; CAS24H: $0,090 \pm 0,005$; CAS72H: $0,067 \pm 0,004$; CAS7D: $0,052 \pm 0,002$; CAS21D: $0,022 \pm 0,003$, em ng/dL), o que não foi acompanhado de alterações nos níveis de 17β -Estradiol (SHAM: $4,5 \pm 0,9$; CAS24H: $3,7 \pm 0,7$; CAS72H: $3,9 \pm 0,6$; CAS7D: $4,2 \pm 0,8$ e CAS21D: $3,8 \pm 0,6$ em ng/dL). A castração levou a uma redução gradual do funcionamento do RBJ, a partir de 72h, as quais atingiram o máximo após 21 dias nos grupos castrados em comparação com o grupo SHAM (6 µg/kg; SHAM: 77 ± 7 ; CAS24H: 63 ± 10 ; CAS72H: 55 ± 6 ; CAS7D: 54 ± 4 ; CAS21D: 35 ± 2 , em %). Não foi observada diferença nos valores basais de Pressão Arterial Média (PAM) (SHAM: 104 ± 3 ; CAS24H: 101 ± 5 ; CAS72H: 108 ± 4 ; CAS7D: 110 ± 4 e CAS21D: 105 ± 4 , em mmHg) e FC dos grupos experimentais (SHAM: 306 ± 9 ; CAS24H: 295 ± 11 ; CAS72H: 314 ± 11 ; CAS7D: 310 ± 10 e CAS21D: 299 ± 11 , em bpm). A atividade da ECA no coração (ECAcor) apresentou redução a partir do grupo CAS72H (SHAM: 107 ± 6 ; CAS24H: 92 ± 2 ; CAS72H: 82 ± 3 ; CAS7D: 54 ± 3 e CAS21D: 43 ± 4 em %). Além disso, a queda em ECAcor ocorreu de forma gradual até atingir o menor valor no grupo com o maior tempo de castração (CAS21D). Da mesma forma, a atividade da ECA plasmática (ECAplas) também foi reduzindo à medida que o tempo de castração se estendia (SHAM: 135 ± 8 ; CAS24H: 102 ± 5 ; CAS72H: 99 ± 3 ; CAS7D: 89 ± 4 e CAS21D: 56 ± 6 em %). Conclui-se que a castração de animais machos determinou redução dos níveis

de testosterona já a partir de 24 horas, redução de atividade da ECA e redução da sensibilidade do RBJ após sete dias, o que não esteve relacionado com alterações morfométricas cardíacas e hemodinâmica cardiovascular.

PALAVRAS-CHAVE: Sistema renina-angiotensina, Reflexo Bezold-Jarisch, Testosterona.

ABSTRACT

HERINGER, Otávio Arruda. MSc. Pharmaceutical Sciences, Universidade Vila Velha-ES, March 2014, **Reduced sensitivity of Bezold-Jarisch and activity of angiotensin-converting enzyme in castrated rats**. Leader: Tadeu Uggere de Andrade.

The role that androgens play in blood pressure control in men, especially in elderly, is not clear. Among distinct mechanisms of cardiovascular system control, stand out the cardiovascular reflexes, such as the Bezold-Jarisch Reflex (BJR), and Renin-Angiotensin System (RAS). Relation between RAS and BJR has been reported where a RAS positive effect on BJR function is observed. Additionally, relation between androgens, BJR and RAS already reported, shows that the BJR loss supraphysiological androgens analogs doses induced occurs at least in part, by RAS influence. However, relation between testosterone physiological levels on BJR and RAS has not been studied yet. The aim of study was to determine influence of rats castration on cardiopulmonary reflex functioning (Bezold-Jarisch), cardiac morphometric parameters and plasma and cardiac Angiotensin Converting Enzyme (ACE) activity. Animals were split into SHAM group, rats underwent sham surgery, CAS24H, CAS72H, CAS7D and CAS21D consisting of castrated rats where time after castration was 24 and 72 hours, 7 and 21 days, respectively. BJR sensitivity was studied by examining the maximum bradycardia and hypotensive responses elicited by an i.v. bolus injection of phenyldiguanide (PDG, from 1.5 to 24 mg/kg) in conscious animals. Cardiac and plasmatic ACE activity was determined by Hip-Gly-Gly cleavage reaction, and morphometric parameters: nuclei per field, nuclei perimeter and heart weight / body weight ratio. No morphological changes were observed in groups submitted to castration compared to SHAM group. There was a reduction in testosterone levels after 24 hours of castration reaching the lowest value after 21 days (SHAM: 2.387 ± 0.151 ; CAS24H: 0.090 ± 0.005 ; CAS72H: 0.067 ± 0.004 ; CAS7D: 0.052 ± 0.002 ; CAS21D: 0.022 ± 0.003 , in ng/dL), which was not followed by changes in levels of 17β -Estradiol (SHAM: 4.5 ± 0.9 ; CAS24H: 3.7 ± 0.7 ; CAS72H: 3.9 ± 0.6 ; CAS7D: 4.2 ± 0.8 and CAS21D: 3.8 ± 0.6 , in ng/dL). Castration led to a gradual reduction in BJR functioning, from 72h, which peaked after 21 days in castrated groups compared with SHAM (PDG 6 mg/kg; SHAM: 77 ± 7 ; CAS24H: 63 ± 10 ; CAS72H: 55 ± 6 ; CAS7D: 54 ± 4 ; CAS21D: 35 ± 2 , in %). No difference was observed in Mean Arterial Pressure (MAP) baseline (SHAM: 104 ± 3 ; CAS24H: 101 ± 5 ; CAS72H: 108 ± 4 ; CAS7D: 110 ± 4 and CAS21D: 105 ± 4 , in mmHg) and HR (SHAM: 306 ± 9 ; CAS24H: 295 ± 11 ; CAS72H: 314 ± 11 ; CAS7D: 310 ± 10 and CAS21D: 299 ± 11 , in bpm). Cardiac ACE activity decreased from CAS72H group (SHAM: 107 ± 6 ; CAS24H: 92 ± 2 ; CAS72H: 82 ± 3 ; CAS7D: 54 ± 3 and CAS21D: 43 ± 4 , in %). Furthermore, decrease in cardiac ACE activity occurred gradually, reaching the lowest value in group with longest castration time (CAS21D). Likewise, plasmatic ACE activity was also reduced as time stretched castration (SHAM 135 ± 8 ; CAS24H: 102 ± 5 ; CAS72H: 99 ± 3 ; CAS7D: 89 ± 4 and CAS21D: 56 ± 6 , in %). We conclude that castration of male animals leads decrease in testosterone levels as early as 24 hours, ACE activity reduction and BJR sensitivity loss after seven days of castration, which was not related to cardiac morphometric changes and cardiovascular hemodynamics.

KEYWORDS: Renin-angiotensin System, Bezold-Jarisch Reflex, Testosterone.

SUMÁRIO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO.....	11
MATERIAL E MÉTODOS.....	12
QUESTÕES ÉTICAS.....	12
ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	13
GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	13
PROCEDIMENTO DE CASTRAÇÃO.....	13
REGISTROS HEMODINÂMICOS.....	14
REFLEXO BEZOLD-JARISCH.....	14
NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA E β -ESTRADIOL.....	14
NÍVEL DE HIPERTROFIA CARDÍACA.....	15
ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	15
ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	15
ATIVIDADE DA ECA CARDÍACA E PLASMÁTICA.....	16
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	16
RESULTADOS.....	17
REGISTROS HEMODINÂMICOS E REFLEXO BEZOLD-JARISCH.....	17
NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA E β -ESTRADIOL.....	18
ANÁLISE MORFOMÉTRICA E NÍVEL DE HIPERTROFIA CARDÍACA.....	19
ATIVIDADE DA ECA CARDÍACA E PLASMÁTICA.....	20
DISCUSSÃO.....	23
REFERÊNCIAS.....	24

Influência dos níveis de testosterona sobre o reflexo cardiopulmonar e enzima conversora de angiotensina em ratos

Otávio Arruda Heringer, Karla Oliveira dos Santos Cassaro, Girlândia Alexandre Brasil, Andrews Marques do Nascimento, Tadeu Uggere de Andrade.

(Correspondências devem ser enviadas para Tadeu Uggere de Andrade; Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Vila Velha – UVV, Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista 29102-770 – Vila Velha – ES, Brasil, E-mail: tadeu.andrade@uvv.br)

Abstract

Background

Among distinct mechanisms of cardiovascular system control, stand out the cardiovascular reflexes, such as the Bezold-Jarisch Reflex (BJR), and Renin-Angiotensin System (RAS). Relation between RAS and BJR has been reported where a RAS positive effect on BJR function is observed. However, relation between testosterone physiological levels on BJR and RAS has not been studied yet. The aim of study was to determine influence of rats castration on cardiopulmonary reflex functioning (Bezold-Jarisch), cardiac morphometric parameters and plasma and cardiac Angiotensin Converting Enzyme (ACE) activity.

Results

There was a reduction in testosterone levels after 24 hours of castration reaching the lowest value after 21 days (SHAM: 2.387 ± 0.151 ; CAS24H: 0.090 ± 0.005 ; CAS72H: 0.067 ± 0.004 ; CAS7D: 0.052 ± 0.002 ; CAS21D: 0.022 ± 0.003 , in ng/dL), which was not followed by changes in levels of 17β -Estradiol (SHAM: 4.5 ± 0.9 ; CAS24H: 3.7 ± 0.7 ; CAS72H: 3.9 ± 0.6 ; CAS7D: 4.2 ± 0.8 and CAS21D: 3.8 ± 0.6 , in ng/dL). Castration led to a gradual reduction in BJR functioning, from 72h, which peaked after 21 days in castrated groups compared with SHAM (PDG 6 mg/kg; SHAM: 77 ± 7 ; CAS24H: 63 ± 10 ; CAS72H: 55 ± 6 ; CAS7D: 54 ± 4 ; CAS21D: 35 ± 2 , in %). Cardiac ACE activity decreased from CAS72H group (SHAM: 107 ± 6 ; CAS24H: 92 ± 2 ; CAS72H: 82 ± 3 ; CAS7D: 54 ± 3 and CAS21D: 43 ± 4 , in %). Likewise, plasmatic ACE activity was also reduced as time stretched castration (SHAM 135 ± 8 ; CAS24H: 102 ± 5 ; CAS72H: 99 ± 3 ; CAS7D: 89 ± 4 and CAS21D: 56 ± 6 , in %).

Conclusions

We conclude that castration of male animals leads decrease in testosterone levels as early as 24 hours, ACE activity reduction and BJR sensitivity loss after seven days of castration, which was not related to cardiac morphometric changes and cardiovascular hemodynamics.

KEYWORDS: Bezold-Jarisch Reflex, Renin-angiotensin System, Angiotensin Converting Enzyme, Testosterone.

Introdução

O papel que os andrógenos desempenham no controle da pressão arterial em homens, especialmente com o aumento da idade, não é claro. Dentre os diversos mecanismos de controle do sistema cardiovascular, os reflexos cardiovasculares desempenham papel importante [1], tendo sido reportado que a castração determina redução da sensibilidade do barorreflexo, o que foi restaurada após reposição com testosterona [2]. Os reflexos cardiopulmonares, assim como o barorreflexo arterial, também são ferramentas importantes no controle da pressão arterial [3]. O Reflexo Bezold-Jarisch (RBJ) é um reflexo cardiopulmonar que funciona a partir da estimulação dos receptores serotoninérgicos (5-HT_3) cardiopulmonares, ativando o sistema aferente constituído de fibras não mielinizadas (tipo C) do nervo vago. Os receptores do RBJ, quando ativados, promovem uma diminuição na atividade simpática e um incremento na parassimpática, gerando hipotensão e bradicardia simultânea [1].

Relação entre androgênios e o RBJ tem sido relatada onde foi evidenciado prejuízo do RBJ após oito semanas de tratamento com decanoato de nandrolona (DN) na dose de $10 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{semana}^{-1}$ [4], o que foi prevenido com o co-tratamento com inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA) [5]. Adicionalmente, Franquini *et al.* demonstraram que o dobro da dose por quatro semanas prejudicou o RBJ e, ainda, determinou alterações no perfil de citocinas inflamatórias cardíacas e aumento atividade da Enzima Conversora

de Angiotensina (ECA) cardíaca, com remodelamento e injúria do coração. Entretanto, a influência dos níveis fisiológicos de testosterona sobre o funcionamento deste reflexo em ratos, ainda não foi avaliada.

O Sistema Renina-Angiotensina (SRA) também é importante para a regulação do sistema cardiovascular, sendo observadas diferenças entre gêneros em diversos de seus componentes, o que parece estar relacionado com os níveis circulantes de testosterona e estrogênio [6]. A castração de animais machos é capaz de reduzir o angiotensinogênio [7] e normalizar a diferença entre gêneros na expressão da ECA [8]. Também já foi observado efeito protetor dos androgênios via receptor nuclear de androgênio frente ao remodelamento vascular induzido por ANGII [9]. Correlação entre o SRA e o RBJ foi demonstrada por Veelken *et al.*, que observaram efeito positivo do SRA sobre o funcionamento do RBJ. Adicionalmente, relação entre androgênios, RBJ e SRA já reportada [5,10], indica que o prejuízo do RBJ induzido por doses de abuso de EAA ocorre, pelo menos em parte, pela influência do SRA. Entretanto, a participação deste sistema sobre o efeito dos níveis fisiológicos de testosterona sobre o RBJ também não foi reportada.

Dessa forma, a hipótese deste trabalho foi a de que a redução dos níveis de testosterona após castração de ratos determina prejuízo do RBJ via redução da atividade da ECA. Portanto, o objetivo do estudo foi o de determinar a influência da castração de ratos sobre o funcionamento do reflexo cardiopulmonar (Bezold-Jarisch), parâmetros morfométricos cardíacos e atividade da ECA plasmática e cardíaca.

Métodos

Questões Éticas

O presente trabalho foi realizado de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal [11] e avaliado e aprovado pela Comissão

de Ética, Bioética e Bem Estar Animal da Universidade Vila Velha (CEUA - UVV; Nº 118/2010).

Animais Experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com três meses de idade e com peso corporal variando entre 250-300g. Esses animais foram fornecidos pelo Biotério de Pesquisa do Complexo Biopráticas da Universidade Vila Velha – UVV. Os animais foram mantidos em ambiente com iluminação artificial (ciclo claro-escuro de 12h) e temperatura de 20-25° C e alocados em gaiolas individuais, com ingestão de água e ração (Probiotério, Moinho Primor, S.A) *ad libitum*.

Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais: SHAM, composto de ratos submetidos à cirurgia fictícia e CAS24H, CAS72H, CAS7D e CAS21D, compostos de ratos castrados (n = 8, cada grupo) em que foram realizadas as coletas de sangue para dosagem de testosterona, 17 β -estradiol, atividade da ECA e avaliação do reflexo cardiopulmonar após 24 horas, 72 horas, 7 dias e 21 dias, respectivamente. Foi realizado um estudo prévio e não foi verificada diferença nos parâmetros avaliados entre os tempos de cirurgia fictícia utilizados nos grupos castrados (dados não mostrados). Portanto, foram utilizados os dados do grupo SHAM com 21 dias após cirurgia fictícia, o qual representava o maior período de castração utilizado.

Procedimento de Castração

Castração bilateral foi realizada sob anestesia (Quetamina / Xilazina: 100:10 mg/kg de peso corporal, i.p.). Uma pequena incisão cirúrgica foi feita no centro do escroto e cada testículo exposto por meio do orifício cirúrgico. O ducto deferente e as principais artérias e veias foram isolados, ligados e desconectados permitindo a retirada dos testículos e do epidídimo. A incisão foi, então, suturada e um *swabbe* de iodo-povidine passado no local. Os animais SHAM operados tiveram os testículos expostos, porém sem isolamento. Cada rato recebeu injeção intramuscular de 60.000 U de penicilina

G benzatina e penicilina G procaína e posteriormente foram colocados em gaiolas individuais com livre acesso à água e ração.

Registros Hemodinâmicos

Sob anestesia com Quetamina/Xilazina (100:10 mg/kg de peso corporal, respectivamente, i.p.), a catetrização foi realizada por meio de uma incisão na região inguinal, com posterior isolamento do plexo vâsculo-nervoso, possibilitando a cateterização da artéria e veia femoral, respectivamente, utilizando cateteres de polietileno (PE10 acomplado à PE50, Clay Adans, USA). Os cateteres foram mantidos preenchidos com solução salina (0,9%) e ocluídas com pinos de aço inoxidável. O cateter arterial femoral esquerdo foi conectado a transdutores de pressão (Spectramed – Statham, P23XL, USA) através de um cateter flexível, e os valores de registro da pressão arterial média (PAM), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) foram obtidos através de um sistema computadorizado e um programa para aquisição de dados biológicos (BIOPAC – BIOPAC Systems, Inc., Santa Barbara, Califórnia, USA, mod. MP 100A/série 94111065), 24h após o procedimento de cateterização. O cateter venoso femoral foi utilizado para infusão das doses de fenilbiguanida.

Reflexo Bezold-Jarisch

O reflexo foi ativado quimicamente pela injeção intravenosa *in bolus* de cinco doses randomizadas de fenilbiguanida (FBG) (1,5 -24µg/Kg de peso corporal). O reflexo foi identificado por reduções dose-dependente na FC e PAD, simultaneamente, e avaliado através do valor relativo máximo de queda da FC e PAD após cada dose de fenilbiguanida [12].

Níveis Plasmáticos de Testosterona e β -Estradiol

Após a avaliação do RBJ o sangue foi coletado por punção cardíaca. As análises bioquímicas para a determinação de testosterona e β -estradiol foram realizadas por meio de kits de ensaio imunoenzimático (AccuBind™

Testosterone ELISA Test System Cod: 3725-300; AccuBind Estradiol (E2) ELISA Cod: 4925-300; Monobind Inc., EUA).

Nível de Hipertrofia Cardíaca

Após o registro hemodinâmico e avaliação do RBJ, os ratos foram eutanasiados e o coração foi, então, isolado e lavado com solução fisiológica. O excesso do líquido foi removido com papel de filtro e o coração pesado em balança analítica (Shimadzu Corporation ©, Kyoto, Japão). A razão do peso do coração pelo peso corporal (COR/PC) foi usada como índice de hipertrofia cardíaca. Uma alíquota foi acondicionada em formol a 10% por 48 horas e encaminhada para a análise histológica [13], e outra foi reservada em -80°C para avaliação da atividade da ECA cardíaca.

Análise Histológica

Após a clivagem do coração, os fragmentos foram incluídos em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo rotativo (Leica® RM 2125RT; Nussloch, Germany), com cinco micrômetros de espessura. Os cortes histológicos foram estendidos em lâminas de vidro e corados pelo método de Hematoxilina-Eosina (H&E), para a avaliação morfométrica dos miócitos cardíacos.

A avaliação histológica se deu por patologista, sem conhecimento prévio da divisão dos grupos, em microscópio ótico binocular (Leica DM/LS, Leica – Germany) acoplado ao sistema de aquisição e análise histológica (MOTICOM 2000; MOTIC INSTRUMENTS INC., Canadá).

Análise Morfométrica

Após a avaliação histológica, foi realizada a captura de imagens, dez campos de cada lâmina, para análise morfométrica. Foram avaliados os seguintes parâmetros: perímetro dos núcleos dos miócitos e número de miócitos por campo em aumento de 400x. Para a captura e análise das imagens foi utilizado

microscópio óptico binocular (Leica DM/LS, Leica – Germany) acoplado ao sistema de aquisição e análise morfométrica (MOTICOM 2000; MOTIC INSTRUMENTS INC., Canadá), respectivamente.

Atividade da ECA cardíaca e plasmática

A atividade da ECA foi determinada por medição de Gli-Gli (glycyl-glicina), produto de clivagem de Hip-Gli-Gli pela ECA como descrito anteriormente [10]. Resumidamente, uma alíquota de 1g de coração de rato foi adicionada a um tubo de centrífuga contendo 5,0mL de tampão fosfato, pH 8,3 (50mM), e submetido a uma ligeira rotação. A mistura foi então centrifugada a 3.000g durante 40 min à temperatura ambiente. Para a reação enzimática, uma alíquota do sobrenadante (concentração final de 100 mg/mL) e o controle positivo, a solução de pulmão coelho (concentração final 9,1 mg/mL, Sigma, EUA), foram combinadas com o tampão de ensaio e tampão da solução de substrato Hip-Gli-Gli (100mM; Sigma, EUA). Para a avaliação da ECA plasmática foi utilizada uma alíquota de 10µL do soro. Em ambos os casos, após a homogeneização, a mistura foi incubada durante 35 min a 37°C. A reação foi parada pela adição de tungstato de sódio (300 mM) e ácido sulfúrico (0,33 mM). O sistema foi misturado com o reagente de coloração TNBS (Sigma, EUA). Após 20 min, no escuro, a absorvância da placa foi lida num leitor de placa de microtitulação (TP-Reader, Thermoplate), a 420 nm contra um ensaio em branco. A solução em branco foi preparada de forma semelhante, com exceção do tungstato de sódio e as soluções de ácido sulfúrico as quais foram adicionados antes da solução de enzima. O ensaio foi também realizado na presença de 10uL de solução de captopril (concentração final de 64nM). Os ensaios foram realizados em triplicata. A atividade da ECA foi calculada de acordo com a equação % de atividade = $(A \times 100)/B$, onde A é a absorvância de coração de rato medida a 420 nm e B é a absorvância da solução de pulmão de coelho.

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). Para análise estatística dos valores basais de PAM e FC, peso corporal, peso das câmaras cardíacas, valores de estimativa de hipertrofia cardíaca e parâmetros morfométricos cardíacos; os mesmos foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA). Para análise estatística das mudanças na FC e PAD provocadas pelo reflexo Bezold-Jarisch foi efetuada análise de variância de duas vias (ANOVA). A significância da diferença entre as médias foi determinada por um teste *post hoc* pelo método de *Tukey*, ajustado para múltiplas comparações. Para a avaliação dos níveis séricos de testosterona e estradiol foi utilizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, sendo evidenciados dados não-paramétricos. Logo, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney. O nível de significância aceito em todas as análises foi acima de 5% ($p < 0,05$). Para análise estatística e apresentação gráfica dos resultados foram empregados os softwares GB-Stat e GraphPad Prism 5.01, respectivamente.

Resultados

Não houve diferença no peso corporal inicial (SHAM: 256 ± 9 ; CAS24H: 279 ± 12 ; CAS72H: 248 ± 8 ; CAS7D: 258 ± 14 e CAS21D: 282 ± 4 em g) e final (SHAM: 289 ± 5 ; CAS24H: 283 ± 4 ; CAS72H: 288 ± 2 ; CAS7D: 280 ± 5 e CAS21D: 339 ± 20 em g). Também não houve diferença no peso dos corações (SHAM: $0,854 \pm 0,05$; CAS24H: $0,911 \pm 0,04$; CAS72H: $0,844 \pm 0,02$; CAS7D: $0,896 \pm 0,07$ e CAS21D: $0,910 \pm 0,05$ em g) entre os grupos experimentais.

Registros hemodinâmicos e Reflexo Bezold-Jarisch

Em relação ao RBJ, a FBG foi capaz de determinar reduções dose-dependentes da PAD e FC. A castração levou a uma redução gradual do funcionamento do RBJ, a partir de 72h, as quais atingiram o máximo após 21 dias nos grupos castrados em comparação com o grupo SHAM (Tabela 1). Não

foi observada diferença nos valores basais de PAM e FC (Tabela 2) dos grupos experimentais.

Tabela 1. Resposta de queda na frequência cardíaca (FC) e pressão arterial diastólica (PAD) induzida por doses crescentes de fenilbiguanida.

Grupos Experimentais	Fenilbiguanida ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)				
	Queda de PAD (%)				
	1,5	3,0	6,0	12	24
SHAM	47 $\pm$ 15	58 $\pm$ 8	77 $\pm$ 7	89 $\pm$ 2	92 $\pm$ 1
CAS24H	39 $\pm$ 11	48 $\pm$ 10	63 $\pm$ 10	81 $\pm$ 5	88 $\pm$ 2
CAS72H	28 $\pm$ 2	49 $\pm$ 10	55 $\pm$ 6 ^{**}	69 $\pm$ 6 ^{**}	85 $\pm$ 2
CAS7D	16 $\pm$ 5 ^{**}	33 $\pm$ 5 ^{**}	54 $\pm$ 4 ^{**}	68 $\pm$ 5 ^{**}	83 $\pm$ 2 [*]
CAS21D	12 $\pm$ 4 ^{**##}	29 $\pm$ 3 ^{**#}	35 $\pm$ 2 ^{**##}	42 $\pm$ 4 ^{**##}	55 $\pm$ 4 ^{**#}
	Queda de FC (%)				
	1,5	3,0	6,0	12	24
	1,5	3,0	6,0	12	24
SHAM	56 $\pm$ 5	75 $\pm$ 2	79 $\pm$ 2	83 $\pm$ 2	87 $\pm$ 2
CAS24H	58 $\pm$ 5	66 $\pm$ 4	76 $\pm$ 2	80 $\pm$ 2	85 $\pm$ 2
CAS72H	40 $\pm$ 11	63 $\pm$ 9	73 $\pm$ 4	80 $\pm$ 3	84 $\pm$ 3
CAS7D	18 $\pm$ 8 ^{**}	51 $\pm$ 7 [*]	78 $\pm$ 1	82 $\pm$ 1	86 $\pm$ 1
CAS21D	16 $\pm$ 4 ^{**}	42 $\pm$ 5 ^{**##}	58 $\pm$ 3 ^{**##}	62 $\pm$ 3 ^{**#}	71 $\pm$ 2 ^{**#}

Os valores estão expressos como a média $\pm$ E.P.M, comparados por ANOVA duas vias, seguido pelo teste post-hoc Tukey. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ com comparação a SHAM. # $p < 0.05$ e ## $p < 0.01$ em comparação a CAS7D.

Níveis plasmáticos de Testosterona e β -Estradiol

A partir de 24 horas do procedimento de castração as concentrações plasmáticas de testosterona apresentaram diferença em relação ao grupo SHAM. À medida que o tempo de castração aumentou houve queda adicional nos níveis de testosterona, atingindo seu máximo com 21 dias de castração (Figura 2; painel A). Esse resultado não foi acompanhado de alterações nos

valores de 17β -estradiol (SHAM: $4,5\pm0,9$; CAS24H: $3,7\pm0,7$; CAS72H: $3,9\pm0,6$; CAS7D: $4,2\pm0,8$ e CAS21D: $3,8\pm0,6$ em ng/dL). No painel A da Figura 2 estão apresentados os valores dos níveis séricos de testosterona dos grupos (SHAM: $238,7\pm15,1$; CAS24H: $9,0\pm0,5$; CAS72H: $6,7\pm0,4$; CAS7D: $5,2\pm0,2$ e CAS21D: $2,2\pm0,3$ em ng/dL).

Análise morfométrica e nível de hipertrofia cardíaca

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados para os valores da relação COR/PC, número de núcleos por campo e perímetro nuclear. Em nenhum desses parâmetros houve diferença entre os grupos de animais. Na Figura 1 estão apresentados cortes histológicos representativos de cada grupo.

Tabela 2. Dados de Pressão Arterial Média (PAM), Frequência Cardíaca (FC), Relação (COR/PC) e de morfometria cardíaca dos grupos experimentais.

Grupos Experimentais	PAM (mmHg)	FC (bpm)	COR/PC (mg/g)	Número de núcleos/campo	Perímetro nuclear (μm)
SHAM	104 $\pm$ 3	306 $\pm$ 9	3,33 $\pm$ 0,07	5,3 $\pm$ 0,4	515 $\pm$ 32
CAS24H	101 $\pm$ 5	295 $\pm$ 11	3,34 $\pm$ 0,10	4,9 $\pm$ 0,3	569 $\pm$ 30
CAS72H	108 $\pm$ 4	314 $\pm$ 11	3,17 $\pm$ 0,05	4,8 $\pm$ 0,3	566 $\pm$ 28
CAS7D	110 $\pm$ 4	310 $\pm$ 10	3,59 $\pm$ 0,11	5,6 $\pm$ 0,5	503 $\pm$ 37
CAS21D	105 $\pm$ 4	299 $\pm$ 11	3,28 $\pm$ 0,23	5,3 $\pm$ 0,4	556 $\pm$ 26

Os valores estão expressos como a média $\pm$ E.P.M.

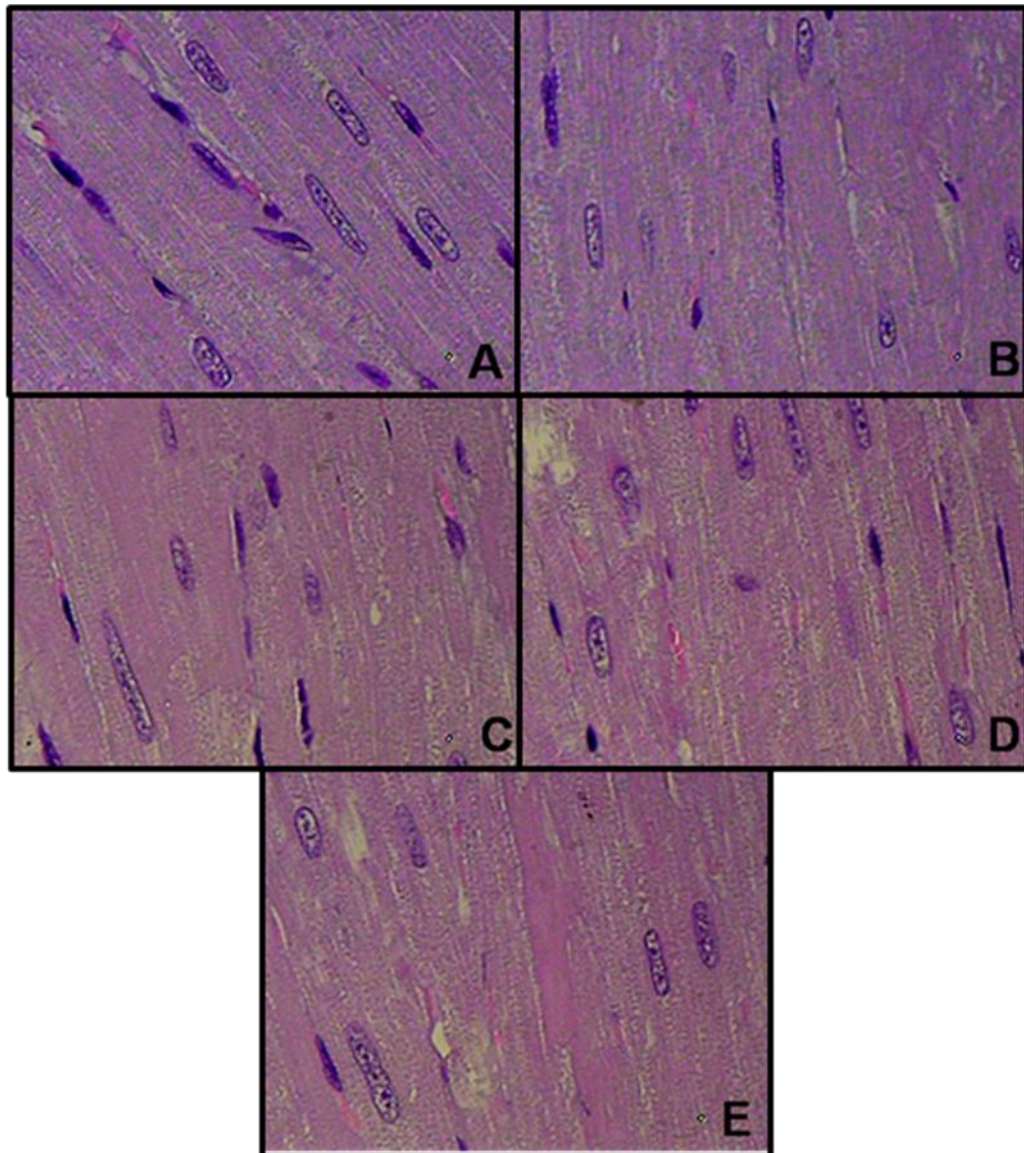


Figura 1 Cortes histológicos representativos dos corações dos animais experimentais. Lâminas coradas pelo método Hematoxilinalin/Eosina (H&E): 400x (A: SHAM; B: CAS24H; C: CAS72H; D: CAS7D; E: CAS21D). Análise morfológica realizada utilizando o software Moticam Plus 2000.

Atividade da ECA cardíaca e plasmática

A atividade da ECA no coração (ECAcor) apresentou redução a partir do grupo CAS72H (SHAM: 107 ± 6 ; CAS24H: 92 ± 2 ; CAS72H: 82 ± 3 ; CAS7D: 54 ± 3 e CAS21D: 43 ± 4 em %). Além disso, a queda em ECAcor ocorreu de forma gradual até atingir o menor valor no grupo com o maior tempo de castração (CAS21D). Da mesma forma, a redução na atividade da ECA plasmática

(ECA_{plas}) também foi aumentando à medida que o tempo de castração se estendia (SHAM: 135±8; CAS24H: 102±5; CAS72H: 99±3; CAS7D: 89±4 e CAS21D: 56±6 em %). Todavia, não houve diferença na redução da ECA_{plas} entre os grupos CAS24H e CAS72H. Os dados de atividade da ECA no coração e no plasma estão representados no painel C da Figura 2.

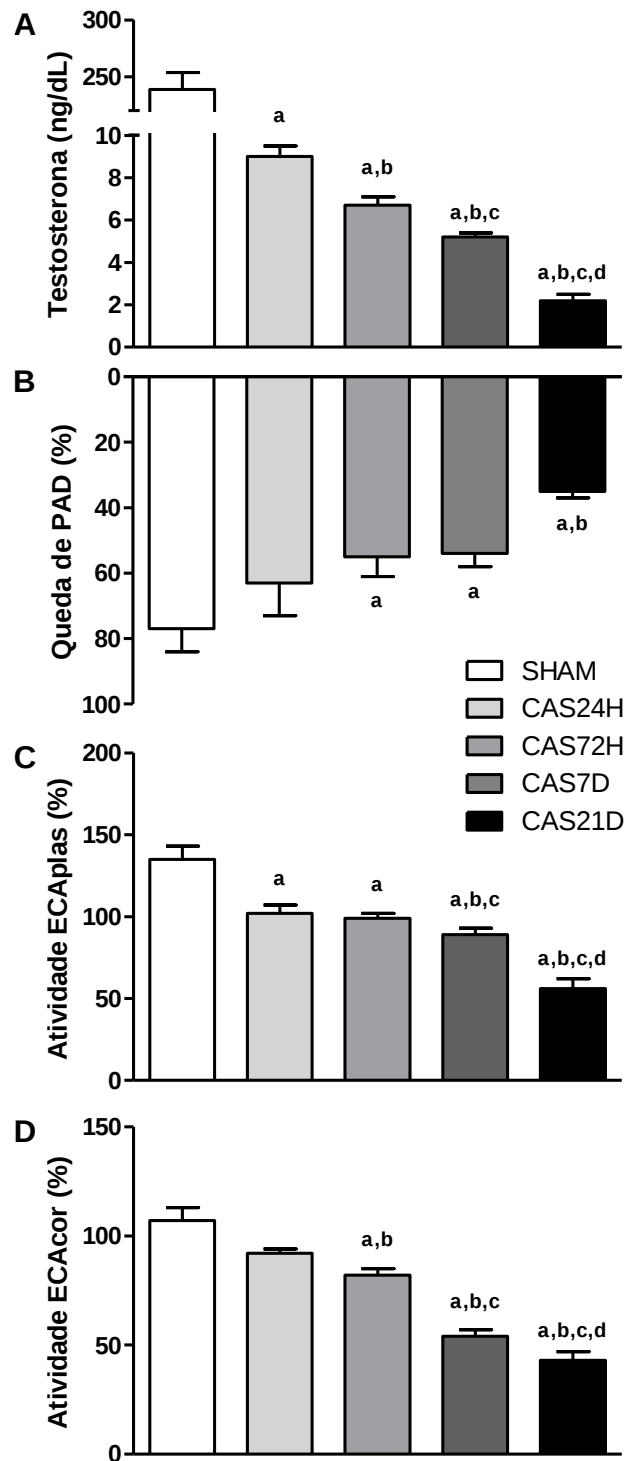


Figura 2 (A) Níveis séricos de testosterona. (B) Resposta de queda na PAD na dose de $6\mu\text{g.kg}^{-1}$. (C) Atividade da ECA no plasma e (D) no coração nos grupos experimentais. Os valores estão expressos como média $\pm$ E.P.M. ^a $p < 0,05$ em relação aos animais SHAM; ^b $p < 0,05$ em relação aos animais 24h; ^c $p < 0,05$ em relação aos animais 72h; ^d $p < 0,05$ em relação aos animais 7D.

Discussão

O principal achado do presente estudo foi a observação de que ratos castrados desenvolvem prejuízo do RBJ e redução da atividade da ECA, tanto plasmática quanto cardíaca, em especial após sete dias de castração, o que não foi acompanhado de elevação da PAM ou desenvolvimento de hipertrofia cardíaca. A redução da sensibilidade do RBJ parece ter ocorrido de maneira gradativa, visto que, no grupo CAS24H não houve prejuízo em nenhuma das doses de fenilbiguanida, no grupo CAS72H houve prejuízo em apenas duas doses ($6,0$ e $12,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$), no grupo CAS7D houve prejuízo em todas as doses, em relação à PAD, e prejuízo adicional foi observado no grupo castrado com 21 dias. Da mesma forma, apesar de ter havido uma queda brusca dos níveis de testosterona já com 24 h, os mesmos tiveram quedas adicionais atingindo o mínimo (abaixo do limite de quantificação) em 21 dias.

Estudos objetivando avaliar a relação entre reflexos cardiovasculares e testosterona ainda são escassos. Já foi evidenciada atenuação na bradicardia mediada pelo barorreflexo em ratos castrados, sendo esta restaurada após reposição de testosterona a níveis fisiológicos [2,14]. Por outro lado, existem estudos que atribuem prejuízo no RBJ com doses elevadas de nandrolona [4], e, curiosamente aumento da atividade da ECA [10,15]. Entretanto, nesses estudos houve hipertrofia cardíaca e elevação da PAM, o que difere do presente trabalho, onde não foram observadas alterações na PAM, FC e nem em quaisquer parâmetros cardíacos. Estas observações conduzem à conjectura de que o mecanismo pelo qual a redução dos níveis de testosterona leva a um prejuízo no RBJ poderia estar relacionado à influência sobre outro ponto do arco reflexo, diferente da zona reflexogênica, ou ainda sobre outros fatores humorais que possam exercer efeito sobre o RBJ. Dessa forma, os níveis séricos de testosterona parecem estar diretamente ligados a homeostase da sensibilidade do RBJ.

Em relação à influência de fatores humorais, a redução da atividade cardíaca e plasmática da ECA observada nos grupos de animais castrados seria uma alternativa para explicar o prejuízo do RBJ. A diferença de gênero quanto à

expressão da ECA é conhecida e os animais machos apresentam maior expressão dessa enzima e maior produção de angiotensina-II, sendo atribuído à testosterona um efeito positivo na mesma [8]. Do mesmo modo, os níveis plasmáticos de testosterona foram relacionados a outros aspectos dos componentes do SRA, tais como a redução da expressão de RNAm para angiotensinogênio em animais castrados seguida de aumento após administração de testosterona [7,16], aumento de resposta vascular à ANGII [17,18], e, ainda, aumento de expressão de receptores AT₂ com consequente atenuação após a reposição com testosterona [19]. Assim como em nosso estudo, a redução da atividade plasmática da ECA também foi observada por Lim *et al.*, sendo esta queda maior em machos. Logo, é notável a relação dos andrógenos com a atividade da ECA, sendo observados tanto valores reduzidos associados a castração [20], quanto valores elevados após tratamento com doses elevadas de EAA [10].

A relação entre o SRA e o RBJ foi avaliada, onde animais tratados com um inibidor da ECA apresentaram prejuízo na bradicardia reflexa com posterior restauração após tratamento com ANGII, o que sugere um efeito positivo do SRA sobre o RBJ [21]. Para Veelken *et al.* o sítio de ação mais provável da ANGII para os efeitos observados no reflexo cardiopulmonar seria o núcleo do trato solitário (NTS), o qual sofre influência dos níveis plasmáticos de ANGII via conexões aferentes da área postrema, que possui alta densidade de receptores de ANGII. Adicionalmente, Endoh *et al.* descrevem em sua revisão outros aspectos funcionais da ANGII no NTS, destacando não somente a presença de receptores de ANGII, como também de outros componentes como o angiotensinogênio e a ECA no NTS [22]. Assim, o prejuízo no RBJ nos grupos experimentais, pode ser relacionado, ao menos em parte, à redução da atividade da ECA. Após a castração, há redução nos níveis fisiológicos de testosterona podendo determinar redução de ANGII pela parcial diminuição da atividade da ECA, com consequente atenuação da bradicardia e da hipotensão reflexa induzidas por FBG.

Outro ponto a ser considerado seria a sensibilidade dos receptores 5-HT₃ frente à possível elevação de bradicinina. Conforme descrito por Kraye os reflexos cardiopulmonares sensíveis à estímulos químicos também podem ser ativados pela bradicinina, que sabidamente é degradada pela ECA [23]. Uma vez reduzida a atividade da ECA, ocorre elevação de bradicinina, podendo levar a dessensibilização dos receptores 5-HT₃ nas vias vagais aferentes [24-26].

Adicionalmente, a participação do peptídeo natriurético atrial (PNA) poderia ser esperada, uma vez que, em miócitos cardíacos, androgênios são capazes de aumentar a secreção de PNA, via ação em RA [27] e, ainda, animais knock-out para RA apresentam menor expressão de RNAm para PNA [28]. Também importante o fato de a ANGII aumentar a expressão de PNA, o que é atenuado em animais knock-out para RA [28]. Isso indica uma interrelação entre androgênios, SRA e PNA, o que poderia ajudar a explicar os dados deste trabalho, uma vez que o PNA exerce, também, efeito positivo sobre o funcionamento do RBJ [29].

A avaliação dos níveis plasmáticos de testosterona foi imprescindível para estabelecer uma evidência sustentada da eficiência do procedimento de castração dos animais, visto que, estudos conflitam em relação ao tempo necessário para o nível de testosterona atingir valores reduzidos. Há protocolos que são iniciados 15 dias após castração [30], 21 dias após castração [2,19] e 28 dias após castração [31]. Dessa maneira, foi verificada que a queda com diferença significativa entre os grupos já ocorre a partir de 24 horas do procedimento de castração, atingindo nível máximo em 21 dias, o que não foi acompanhado de alterações nos níveis de 17β-estradiol. Aumento de bradicardia mediada pelo barorreflexo e atividade vagal eferente já foi observada em ratos tratados com 17β-estradiol [32], o que leva a consideração deste aumento ocorrer secundariamente à conversão de testosterona à 17β-estradiol [2]. Porém, assim como em nosso trabalho, Ward & Abdel-Rahman não encontraram alterações nos níveis de 17β-estradiol nos animais castrados, o que sugere que a interferência no reflexo, em seu estudo, ocorre por ação da

testosterona ou outro metabólico androgênico. Da mesma forma, o prejuízo no RBJ observado no presente trabalho estaria relacionado à redução dos níveis de testosterona e não aos níveis de 17 β -estradiol, sendo considerada a participação do SRA na redução da atividade deste reflexo.

Sumariando, pode-se observar influência positiva da testosterona sobre a sensibilidade do RBJ. A castração determina redução dos níveis plasmáticos de testosterona e redução da atividade da ECA plasmática e cardíaca sem influenciar os níveis de 17 β -estradiol e parâmetros morfológicos cardíacos. Em conjunto, essas alterações levam ao prejuízo no controle reflexo da pressão arterial e frequência cardíaca pelo RBJ.

Referências

1. Kraye O: **The history of the Bezold-Jarisch effect.** *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 1961, **240**:361-368.
2. Ward GR, Abdel-Rahman AA: **Effect of testosterone replacement or duration of castration on baroreflexbradycardia in conscious rats.** *BMC Pharmacol* 2005, **3**:9.
3. Vasquez EC, Meyrelles SS, Mauad H, Cabral AM: **Neural reflex regulation of arterial pressure in pathophysiological conditions: interplay among the baroreflex, the cardiopulmonary reflexes and the chemoreflex.** *Braz J Med Biol Res* 1997, **30**:521-532.
4. Bissoli NS, Medeiros AR, Santos MC, Busato VC, Jarske RD, Abreu GR, Moyses MR, De Andrade TU: **Long-term treatment with supraphysiological doses of nandrolone decanoate reduces the sensitivity of Bezold-Jarisch reflex control of heart rate and blood pressure.** *Pharmacol Res* 2009, **59**:379-384.
5. Uggere de Andrade T, Loiola LZ, Alcure SM, Medeiros AR, Santos MC, Moyses MR, Abreu GR, Lenz D, Bissoli NS: **Role of the renin-angiotensin**

system in the nandrolone-decanoate-induced attenuation of the Bezold-Jarisch reflex. *Can J Physiol Pharmacol* 2011, 89:891-897.

6. Maric-Bilkan C, Manigrasso MB: **Sex Differences in Hypertension: Contribution of the Renin–Angiotensin System.** *Gend Med* 2012, 9:287-291.

7. Yanes LL, Sartori-Valinotti JC, Iliescu R, Romero DG, Racusen LC, Zhang H, Reckelhoff JF: **Testosterone-dependent hypertension and upregulation of intrarenal angiotensinogen in Dahl salt-sensitive rats.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2009, 296:F771-F779.

8. Freshour JR, Chase SE, Vikstrom KL: **Gender differences in cardiac ACE expression are normalized in androgen-deprived male mice.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012, 283:H1997–H2003.

9. Ikeda Y, Aihara K, Yoshida S, Sato T, Yagi S, Iwase T, Sumitomo Y, Ise T, Ishikawa K, Azuma H, Akaike M, Kato S, Matsumoto T: **Androgen-Androgen Receptor System Protects against Angiotensin II-Induced Vascular Remodeling.** *Endocrinology* 2009, 150:2857-2864.

10. Franquini JVM, Nascimento AM, Lima EM, Brasil GA, Heringer OA, Cassaro KOS, Cunha TVP, Musso C, Santos MCS, Kalil IC, Endringer DC, Boëchat GA, Bissoli NS, Andrade TU: **Nandrolone decanoate determines cardiac remodelling and injury by an imbalance in cardiac inflammatory cytokines and ACE activity, blunting of the Bezold–Jarisch reflex, resulting in the development of hypertension.** *Steroids* 2013, 78:379-385.

11. COBEA: **Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, Princípios Éticos na Experimentação Animal.** 1991.

12. Uggere TA, Abreu GR, Sampaio KN, Cabral AM, Bissoli NS: **The cardiopulmonary reflexes of spontaneously hypertensive rats are normalized after regression of left ventricular hypertrophy and hypertension.** *Braz J Med Biol Res* 2000, 33:589-594.

13. Andrade TU, Santos MCS, Busato VC, Medeiros ARS, Abreu GR, Moyses M, Bissoli NR: **Higher physiological doses of nandrolone decanoate do not influence the Bezold-Jarisch reflex control of bradycardia.** *Arch Med Res* 2008, 39:27-32.
14. El-Mas MM, Afify EA, El-Din MMM, Omar AG, Sharabi FM: **Testosterone Facilitates the Baroreceptor Control of Reflex Bradycardia: Role of Cardiac Sympathetic and Parasympathetic Components.** *J Cardiovasc Pharmacol* 2001, 38:754-763.
15. Do Carmo EC, Fernandes T, Koike D, Silva Jr. ND, Mattos KC, Rosa KT, Barretti D, Melo SFS, Wichi RB, Irigoyen MCC, Oliveira EM: **Anabolic Steroid Associated to Physical Training Induces Deleterious Cardiac Effects.** *Med Sci Sports Exerc* 2011, 43:1836-1848.
16. Chen YF, Naftilan AJ, Oparil S: **Androgen-dependent angiotensinogen and renin messenger RNA expression in hypertensive rats.** *Hypertension* 1992, 19:456-463.
17. Xue B, Pamidimukkala J, Hay M: **Sex differences in the development of angiotensin II-induced hypertension in conscious mice.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005, 288:H2177-H2184.
18. Song J, Kost Jr. CK, Martin DS: **Androgens augment renal vascular responses to ANG II in New Zealand genetically hypertensive rats.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006, 290:R1608–R1615.
19. Kang N, Fu L, Xu J, Han Y, Cao J, Sun J, Zheng M: **Testosterone improves cardiac function and alters angiotensin II receptors in isoproterenol-induced heart failure.** *Arch Cardiovasc Dis* 2012, 105:68-76.
20. Lim YK, Retman L, Bhagavath B, Sethi SK, Ali AB, Lim SK: **Gonadal effects on plasma ACE activity in mice.** *Atherosclerosis* 2002, 160:311–316.
21. Veelken R, Hilgers KF, Scrogin KE, Mann JFE, Schmieder RE: **Endogenous angiotensin II and the reflex response to stimulation of**

cardiopulmonary serotonin 5HT₃ receptors. *Br J Pharmacol* 1998, 125:1761-1767.

22. Endoh T: **Role of Angiotensin II in Nucleus Tractus Solitarius,** *J Oral Biosci* 2007, 49:89-96.

23. Ondetti MA, Cushman DW: **Inhibition of the renin-angiotensin system. A new approach to the therapy of hypertension.** *J Med Chem* 1981, 24:355-361.

24. Whalen EJ, Johnson AK, Lewis SJ: **Functional evidence for the rapid desensitization of 5-HT₃ receptors on vagal afferents mediating the Bezold–Jarisch reflex.** *Brain Res* 2000, 873:302-305.

25. Owen JA, Bates JN, Lewis SJ: **Endogenous nitrosyl factors may inhibit the desensitization of 5-HT₃ receptors on vagal cardiopulmonary afferents.** *Brain Res* 2005, 1059:167-172.

26. Lacolley PJ, Owen JR, Bates JN, Johnson AK, Lewis SJ: **Tachyphylaxis to 5-HT₃-receptor-mediated activation of vagal afferents is prevented by co-activation of 5-HT₂ receptors.** *Brain Res* 2006, 1093:105-115.

27. Marsh JD, Lehmann MH, Ritchie RH, Gwathmey JK, Green GE, Schiebinger RJ: **Androgen Receptors Mediate Hypertrophy in Cardiac Myocytes.** *Circulation* 1998, 98:256-261.

28. Ikeda Y, Aihara K, Sato T, Akaike M, Yoshizumi M, Suzaki Y, Izawa Y, Fujimura M, Hashizume S, Kato M, Yagi S, Tamaki T, Kawano H, Matsumoto T, Azuma H, Kato S, Matsumoto T: **Androgen receptor gene knock-out male mice exhibit impaired cardiac growth and exacerbation of angiotensin II-induced cardiac fibrosis.** *J Biol Chem* 2005, 280:29661–29666.

29. Thomas CJ, May CN, Sharma AD, Woods RL: **ANP, BNP, and CNP enhance bradycardic responses to cardiopulmonary chemoreceptor activation in conscious sheep.** *Am J Physiol-Reg I* 2001, 280:282-288.

30. Zhou P, Fub 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* 2008, 593:87-91.
31. Nakazawa R, Tanaka M, Takahashi T, Kobayashi S, Iwamoto T: **Effects of Castration and Testosterone Administration on Angiotensin II Receptor mRNA Expression and Apoptosis-related Proteins in Rat Urinary Bladder.** *Endocr J* 2007, 54:211-219.
32. Saleh TM, Connell BJ: **Centrally mediated effect of 17 β -estradiol on parasympathetic tone in male rats.** *Am J Physiol-Reg I* 1999, 276:474-481.