Andréia Zago Chignalia

**Testosterona induz migração de células da musculatura
lisa vascular de ratos espontaneamente hipertensos por
mecanismos dependentes de EROs e ativação da NADPH
oxidase via c-Src**

Tese Apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Dra. Rita de Cássia Aleixo
Tostes Passaglia

São Paulo

2009

RESUMO

CHIGNALIA, A. Z. **Testosterona induz migração de células da musculatura lisa vascular de ratos espontaneamente hipertensos por mecanismos dependentes de EROs e ativação da NADPH oxidase via c-Src.** Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O dimorfismo sexual relacionado à hipertensão arterial surge na adolescência e persiste por toda vida adulta. Homens apresentam maior incidência de doenças cardiovasculares quando comparados a mulheres de mesma faixa etária. O mesmo perfil é observado em modelos animais de hipertensão, nos quais machos apresentam maiores níveis pressóricos quando comparados a fêmeas. Dessa forma, a testosterona é frequentemente relacionada à hipertensão arterial. Entretanto, os mecanismos pelos quais a testosterona exerce efeitos vasculares ainda não estão esclarecidos. O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da testosterona sobre a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), importantes mediadores do processo hipertensivo, em células da musculatura lisa vascular (CMLV) de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos (SHR). Os receptores para andrógenos, as fontes de EROs (papel da NADPH oxidase), bem como os efeitos funcionais celulares (migração celular) relacionados aos efeitos da testosterona também foram analisados. Para tanto, CMLV do leito mesentérico de ratos Wistar (W), Wistar-Kyoto (WKY) e SHR foram isoladas, cultivadas e estimuladas com testosterona 10^{-7} mol/L em diferentes tempos, de acordo com cada protocolo. Sempre que necessário, as células foram pré-incubadas por 30 minutos com inibidores específicos para o estudo dos mecanismos envolvidos, tais como: flutamida (inibidor do receptor clássico para andrógenos), apocinina (inibidor da NADPH oxidase), PP2 (inibidor da c-Src), actinomicina D (inibidor da transcrição gênica) e cicloheximida (inibidor da síntese protéica). Nossos resultados indicam que a testosterona induz a geração de EROs por mecanismos dependentes do tempo e da linhagem de ratos, de modo que células isoladas de animais SHR são mais sensíveis a testosterona. Esta geração ocorre por dois mecanismos principais: um mediado pelo receptor clássico para andrógenos (AR) e outro mediado pelo receptor de membrana para andrógenos (ARm), resultando em efeitos genômicos e não-genômicos,

respectivamente. Enquanto os efeitos genômicos são comuns, isto é, são observados em células de animais normotensos e hipertensos, os efeitos não-genômicos são específicos, e ocorrem exclusivamente em células de animais hipertensos. A geração genômica de EROs, mediada pelo AR, depende da modulação da expressão de subunidades da NADPH oxidase. Por outro lado, a geração não-genômica, é mediada pelo ARm, independe de síntese protéica, e ocorre devido à ativação de vias de sinalização específicas, reguladoras do complexo enzimático NADPH oxidase. As EROs formadas a partir do estímulo com a testosterona tanto por mecanismos genômicos ou não-genômicos levam a migração celular por mecanismos mediados pelo AR. Nossos resultados sugerem que a testosterona tem papel importante na função de células da musculatura lisa vascular, o que pode contribuir para algumas alterações vasculares características do processo hipertensivo. Portanto, nosso trabalho é o primeiro a demonstrar que a testosterona regula vias de sinalização redox em CMLV levando a efeitos funcionais importantes, relacionados ao remodelamento vascular, os quais podem contribuir para o desenvolvimento e manutenção da hipertensão arterial.

Palavras-chave: Testosterona. Estresse Oxidativo. Migração Celular. c-Src. Músculo Liso Vascular. Hipertensão.

ABSTRACT

CHIGNALIA, A. Z. **Testosterone induces migration of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats via c-Src-dependent NADPH oxidase-driven ROS generation.** PhD Thesis (Pharmacology) – Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2009.

Sexual dimorphism related to hypertension begins at childhood and persists through adulthood. The incidence of cardiovascular diseases is higher in men when compared to age-matched women. Although testosterone has been associated to the sexual dimorphism in hypertension, the mechanisms whereby testosterone acts in the vasculature remain unclear. The main objective of this study was to determine whether testosterone induces reactive oxygen species (ROS) generation, key players on hypertension, in vascular smooth muscle cells (VSMC) isolated from normotensive and hypertensive rats. The signaling pathways and the androgen receptors activated by testosterone, the role of NADPH oxidase in ROS generation and the cellular outcomes (cell migration) were also determined. Accordingly, VSMC isolated from the mesenteric bed of Wistar (W), Wistar-Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive (SHR) rats were stimulated with testosterone 10^{-7} mol/L for different periods of time, according to each protocol. Whenever appropriate, cells were pre-incubated with specific inhibitors, such as flutamide 10^{-5} mol/L (nuclear androgen receptor antagonist), apocynin 3×10^{-5} mol/L (NADPH oxidase inhibitor), PP2 10^{-5} mol/L (c-Src inhibitor), actinomycin D 10^{-5} mol/L (inhibitor of gene transcription), and cycloheximide 10^{-5} mol/L (protein synthesis inhibitor). Our findings demonstrate that testosterone induces ROS formation in a time and strain-dependent manner. Augmentation of ROS formation is higher in SHR-VSMC, indicating an increased sensitivity of SHR-VSMC to testosterone stimuli. Testosterone-induced ROS production occurs by two main mechanisms: the first mediated through the classical androgen receptor (AR) and the second mediated through membrane-associated androgen receptor (ARm), leading to genomic and non-genomic effects, respectively. Whereas the genomic effects occur in VSMC from both strains, non-genomic effects are only observed in SHR-VSMC. The genomic ROS production is mediated through AR and depends on modulation of NADPH oxidase subunits. On the other hand, non-genomic ROS formation is mediated through ARm, does not rely on

protein synthesis and occurs via specific signaling pathways that regulate NADPH oxidase. Genomic and non-genomic ROS production by testosterone leads to a common final effect: VSMC migration, indicating that testosterone plays a key role in VSMC function. These results indicate that testosterone signals through redox-sensitive pathways, important in c-Src-mediated migration of VSMCs in SHR. Such processes may contribute to vascular remodeling in hypertension.

Key words: Testosterone. Oxidative Stress. Hypertension. c-Src. Vascular Smooth Muscle Cells. Cell Migration.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão Arterial

A hipertensão arterial, caracterizada pelo aumento crônico dos níveis pressóricos, é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, uma das principais causas de morte no Brasil e no mundo (DÓREA e LOTUFO, 2009; KEARNEY et al., 2005). De acordo com dados da Sociedade Brasileira de Hipertensão (SBH), 30% dos adultos brasileiros são hipertensos e mais de 150 mil mortes por ano ocorrem devido à hipertensão arterial. Globalmente, estima-se que 927 milhões de adultos sejam hipertensos, o que pode levar a sete milhões de mortes anuais (KEARNEY et al., 2005).

A hipertensão arterial é uma doença crônico-degenerativa (MACMAHON et al., 1990) de caráter multigênico (HARRAP, 1994) e multifatorial (BROWN, 1996) que pode induzir lesões em órgãos-alvo como o coração (hipertrofia ventrículo esquerdo, doença arterial coronariana e disfunção sistólica), olhos (retinopatia), cérebro (acidente vascular encefálico, acidente isquêmico transitório), rins (nefropatia hipertensiva) e vasos sanguíneos (aneurisma da aorta, estenose arterial periférica) (SANJULIANI, 2009).

Além do aumento dos níveis pressóricos, a hipertensão é caracterizada pelo aumento da resistência periférica ao fluxo sanguíneo (LUND-JOHANSEN, 1983) regulada principalmente pelas artérias de resistência (SCHIFFRIN, 2004). Este aumento da resistência periférica na hipertensão decorre de alterações estruturais, processo conhecido como remodelamento vascular, mecânicas ou funcionais nas artérias de resistência (SCHIFFRIN, 2004).

O remodelamento vascular é resposta fisiológica a alterações hemodinâmicas (fluxo e pressão) (BERK, 2001) e do meio ao qual o vaso sanguíneo está exposto (modulação por hormônios) (MULVANY, 2002). Dentre as alterações observadas no remodelamento vascular podemos citar aumento da migração e proliferação e diminuição da apoptose de células da musculatura lisa vascular (CMLV) (BERK, 2001).

Adicionalmente, são observadas mudanças na expressão de componentes da matriz extracelular (BERK, 2001), como por exemplo, o aumento da deposição de colágeno (INTENGAN et al., 1999; INTENGAN e SCHIFFRIN, 2000; INTENGAN et al., 1999) e diminuição da atividade de metaloproteinases (INTENGAN e SCHIFFRIN, 2000).

De modo geral, pode-se dizer que a hipertensão decorre de anormalidades nos mecanismos (centrais e/ou periféricos) de controle da pressão arterial (PA) (KRIEGER e PEREIRA, 2007). No entanto, é importante lembrar que outros fatores podem contribuir para a instalação da hipertensão. Dentre eles: a obesidade, sedentarismo, tabagismo, alcoolismo, diabetes melitus, hipercolesterolemia, idade e sexo.

O dimorfismo sexual associado à hipertensão surge na adolescência e persiste por toda vida adulta (HIMMELMANN et al., 1994; YONG et al., 1993). Estudos epidemiológicos demonstram uma maior incidência de doenças cardiovasculares em mulheres na fase pré-menopausal quando comparadas a homens de mesma idade. Estes mesmos estudos demonstram que após a menopausa as mulheres apresentam a mesma incidência de doenças cardiovasculares (Figura 1), o que sugere que o sexo feminino ou a presença de hormônios sexuais femininos é fator de proteção cardiovascular (BARRETT-CONNOR e BUSH, 1991). Assim, o sexo masculino passou a ser considerado por alguns autores como um fator predisponente para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (LITTLETON-KEARNEY e HURN, 2004).

Dessa forma, muitos pesquisadores têm direcionado seus estudos para as ações do estrógeno no sistema cardiovascular, uma vez que uma das principais características da menopausa é a diminuição da produção dos hormônios sexuais femininos (a concentração plasmática de estradiol que varia entre 210 a 720×10^{-12} mol/L cai para níveis menores que 100×10^{-12} mol/L e a concentração de progesterona cai da faixa de $1,5$ a 35×10^{-9} mol/L para menos que $1,0 \times 10^{-9}$ mol/L) (QIAO et al., 2008). No entanto, é de extrema importância considerar que as alterações hormonais que ocorrem na menopausa não se limitam apenas aos hormônios sexuais femininos, ocorrendo a diminuição de testosterona (da faixa de $1,0$ a $1,5 \times 10^{-9}$ mol/L em mulheres na pré-menopausa para $0,3$ a $0,5 \times 10^{-9}$ mol/L em mulheres na menopausa), levando, portanto,

a alteração do balanço hormonal nessas mulheres, com aumento na relação andrógenos/estrógenos (QIAO et al., 2008). Dessa forma, ainda não está claro se as alterações nos níveis pressóricos em mulheres na menopausa ocorrem por deficiência de estrógenos ou por excesso de andrógenos.

Figura 1. Prevalência da hipertensão em homens e mulheres em idade adulta (>20 anos) *National Center for Health Statistics – USA.*

Similarmente aos humanos, diferenças sexuais com relação à PA também existem em modelos animais de hipertensão. Por exemplo, ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (DANTAS et al., 2002; RECKELHOFF et al., 1998; RECKELHOFF et al., 2000; SILVA-ANTONIALLI et al., 2004), ratos Dahl sensíveis ao sal (CROFTON et al., 1993), ratos com hipertensão induzida por desoxicorticosterona e salina (DAVID et al., 2002; OUCHI et al., 1987), e ratos geneticamente hipertensos New Zealand (ASHTON e BALMENT, 1991) apresentam maior PA do que as fêmeas de mesma linhagem. Nestes modelos, a castração de animais machos leva a redução da

hipertensão, sugerindo que a testosterona pode modular o processo hipertensivo desses animais (RECKELHOFF et al., 1998). No entanto, os mecanismos pelos quais a testosterona pode modular os níveis pressóricos ainda não são conhecidos. Dessa maneira, nossos estudos foram direcionados a investigar os efeitos da testosterona em células da musculatura lisa vascular, isoladas de vasos de resistência, as quais têm papel importante no processo de remodelamento vascular acima mencionado.

Assim, alguns aspectos sobre a síntese e mecanismo de ação e efeitos dos andrógenos no sistema cardiovascular serão abordados a seguir.

1.2 Andrógenos

1.2.1 Síntese e Metabolismo

Em homens, os andrógenos são sintetizados principalmente pelas células de Leydig testiculares, com pequena participação das adrenais, atingindo concentrações plasmáticas que variam entre 1 a 3×10^{-8} mol/L (WINTERS, 1999). Por outro lado, em mulheres, a síntese dos andrógenos ocorre principalmente na zona fasciculada da adrenal (25 %) e no estroma ovariano (25 %). Os 50 % restantes são produzidos no fígado, pele e tecido adiposo (EL-ALFY et al., 1999). Em mulheres na pós-menopausa, os ovários são os principais órgãos secretores de andrógenos (JUDD et al., 1974), formando aproximadamente 25 % da testosterona circulante. A regulação da secreção de andrógenos é feita pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e pelo hormônio luteinizante (LH) (BURGER, 2002) e pela concentração da proteína transportadora de hormônios sexuais (SHBG).

Os principais andrógenos incluem sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS), dehidroepiandrosterona (DHEA), androstenediona, testosterona e dihidrotestosterona (DHT). Sua biossíntese inicia-se a partir da clivagem e hidroxilação do colesterol pela enzima P450 SCC (que promove hidroxilação nas posições 20 e 22 e clivagem da cadeia lateral do colesterol) levando a formação de pregnenolona. A pregnenolona, por

sua vez, pode gerar androstenediona por duas vias: pela formação de progesterona (via 3 β -hidroxi-esteróide desidrogenase) com posterior ação da p450 c17, ou pela formação de DHEA (via formação de 17-hidroxi-pregnenolona mediada pela p450 c17) com posterior hidroxilação pela 3 β -hidroxi-esteróide desidrogenase. Uma vez formada, a androstenediona é convertida a testosterona pela 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase. A testosterona pode então, sofrer ação de duas enzimas: 1) P450 aromatase, presente no fígado, tecido adiposo e pele, responsável pela conversão de testosterona a 17 β -estradiol; e 2) 5 α -redutase, presente na pele, ossos (osteoblastos), endométrio (células epiteliais), córtex cerebral e vasos sanguíneos, que promove a conversão de testosterona a DHT (Figura 2).

Figura 2. Etapas da síntese de andrógenos.

1.2.2 Receptores para Andrógenos e Mecanismos de Ação da Testosterona

Após a testosterona ser sintetizada ocorre a formação do complexo hormônio-transportador (testosterona-SHBG) o qual é liberado na circulação para atingir tecidos-alvos onde o complexo é dissociado para que a testosterona exerça seus efeitos celulares. O andrógeno, então na forma livre, liga-se ao receptor para andrógenos, desencadeando os efeitos celulares deste esteróide (JONES et al., 2004).

Até o presente momento, dois tipos de receptores para andrógenos já foram descritos: o receptor para andrógenos citosólico (AR), também conhecido como o receptor clássico para andrógenos, e o receptor para andrógenos localizado na membrana plasmática (ARm), cuja seqüência e estrutura ainda não foram bem descritas.

O receptor citosólico para andrógenos é um componente da família de receptores nucleares para hormônios esteróides. Esse receptor é uma proteína de 917 aminoácidos composta por um domínio de ligação ao DNA altamente conservado, uma porção carboxi-terminal com sítio de ligação ao hormônio que possui função de dimerização e uma região de transativação N-terminal variável (WILSON e MCPHAUL, 1996).

Existem duas isoformas do receptor clássico para andrógenos, denominadas AR-A e AR-B, provenientes do mesmo transcrito gênico. O AR-B (110 KDa) é a isoforma correspondente a tradução da seqüência completa de nucleotídeos, e AR-A (87 kDa), é a isoforma truncada da proteína AR-B (GAO et al., 2005).

Para que ocorra a ativação desse receptor, a testosterona deve atravessar a membrana plasmática, ligar-se ao AR localizado no citoplasma celular, formando um complexo (testosterona-AR) que migrará para o núcleo. Uma vez no núcleo, o complexo testosterona-AR liga-se ao elemento de resposta para andrógeno (ERA), localizado na região promotora do gene alvo, alterando a transcrição gênica e, conseqüentemente, a tradução protéica. Esses efeitos a longo prazo, e que dependem de modulação gênica e protéica, são denominados efeitos genômicos (Figura 3).

Em 1991, foram descritos pela primeira vez os efeitos rápidos, não-genômicos, da testosterona sobre os níveis de cálcio (Ca^{2+}) intracelular em cultura de células

prostáticas (STEINSAPIR et al., 1991). Posteriormente, foi demonstrada a modulação da concentração de Ca^{2+} intracelular e da formação de diacilglicerol e de inositol-trisfosfato pela testosterona em osteoblastos em cultura (LIEBERHERR e GROSSE, 1994). Estas foram as primeiras evidências de que a testosterona desencadeia ações não genômicas, provavelmente mediadas por um outro tipo de receptor, localizado na membrana celular.

Atualmente, três possíveis receptores para efeitos rápidos dos andrógenos foram propostos:

1. Receptor para SHBG: o complexo testosterona-SHBG permite a ligação ao receptor para SHBG, como descrito em células de linhagem tumoral prostática LNCaP (NAKHLA et al., 1990).
2. AR clássico associado à membrana: ocorre a migração do AR do citoplasma para a membrana celular (PEDRAM et al., 2007; WHITAKER et al., 2004).
3. Receptor de membrana para andrógenos: existência de um receptor específico para andrógenos na membrana celular. Apesar de vários grupos terem relatado a ligação específica da testosterona à membrana plasmática em diferentes tipos celulares ainda não foi clonada ou purificada uma proteína de membrana a qual a testosterona se liga especificamente para exercer seus efeitos rápidos (BENTEN et al., 1999; BENTEN et al., 1997; LYNNG et al., 2000; SUN et al., 2006).

As ações não genômicas diferenciam-se das genômicas por apresentarem resposta rápida, insensibilidade à inibição da síntese de RNA e de proteínas, e pelo fato de esteróides incapazes de atingir o núcleo produzirem tais efeitos que, em sua maioria, não são bloqueados por antagonistas clássicos de ARs (como por exemplo, a flutamida).

Os efeitos não-genômicos dos andrógenos geralmente envolvem rápida ativação de vias de sinalização, indução de mensageiros secundários, aumento do Ca^{2+} citosólico, ativação das proteínas quinases A e C (PKA e PKC, respectivamente) e

ativação de quinases ativadas por mitógenos (MAPKs, *mitogen-activated protein kinases*) levando a diferentes efeitos celulares (HEINLEIN e CHANG, 2002) (Figura 3).

Figura 3. Receptores para andrógenos e mecanismos de ação dos andrógenos.

Os ARs e ARms são expressos em vários tipos celulares, tais como células de musculatura esquelética, fibroblastos, mastócitos, células endoteliais e de músculo liso vascular (LITTLETON-KEARNEY e HURN, 2004; SINHA-HIKIM et al., 2004). Especificamente no sistema cardiovascular, os ARs são expressos por uma variedade de células incluindo as células endoteliais, células do músculo liso vascular, fibras do miocárdio, macrófagos e plaquetas. A quantidade de ARs no miocárdio e na aorta de ratos, coelhos e primatas não humanos são semelhantes entre machos e fêmeas. No entanto, os machos apresentam maior quantidade de receptores nucleares, dado consistente com a maior ativação de AR por testosterona endógena (LIN et al., 1990).

1.2.3 Efeitos dos Andrógenos

Os diferentes tecidos apresentam graus variáveis de sensibilidade à testosterona, os quais podem estar relacionados à heterogeneidade na distribuição tecidual ou expressão dos ARs e de enzimas envolvidas na síntese e degradação dos andrógenos, à ativação de mecanismos não-genômicos e à presença de polimorfismos nos ARs. Como exemplo, a repetição do triplete CAG (poliglutamina) está inversamente relacionada à sensibilidade tecidual a andrógenos (LIU et al., 2003).

Os efeitos vasculares da testosterona são complexos e associados à dose, tempo de exposição, realização dos estudos *in vitro* e/ou *in vivo*, presença de doença cardiovascular e, também, ao sexo. Para exemplificar tal complexidade, podemos citar que testosterona pode causar vasodilatação (ADAMS et al., 1995; DEENADAYALU et al., 2001; JONES et al., 2004; LITTLETON-KEARNEY e HURN, 2004; SARREL, 1999; TATCHUM-TALOM et al., 2002; YUE et al., 1995); ou vasoconstrição (LITTLETON-KEARNEY e HURN, 2004; TEOH et al., 2000) associada à regulação da síntese de agentes vasoativos como a prostaciclina (BERN et al., 1981).

Além de efeitos na modulação do tônus vascular, têm sido mostrados efeitos na função cardíaca, como por exemplo, o comprometimento da cicatrização e remodelamento cardíacos em modelo de infarto do miocárdio (CAVASIN et al., 2006), diminuição da recuperação da função do miocárdio após isquemia e reperfusão (WANG et al., 2005) além de função anti-arterogênica (ALEXANDERSEN et al., 1999; BRUCK et al., 1997; HANKE et al., 2001; LARSEN et al., 1993; NATHAN et al., 2001)

A ambigüidade dos efeitos da testosterona no sistema cardiovascular também pode ser observada na clínica médica. Por exemplo, a reposição com andrógenos pode ter efeito benéfico na presença de doença vascular em homens, enquanto que, em mulheres, pode aumentar o risco de doença cardiovascular (LITTLETON-KEARNEY e HURN, 2004). Por exemplo, a reposição hormonal com testosterona pode levar a diminuição da resposta isquêmica em pacientes com doença cardiovascular (SARREL, 1997) e diminuição da resistência vascular periférica em homens com doença coronariana (PUGH et al., 2003). Além disto, baixos níveis de testosterona têm sido associados à aterosclerose da aorta e carótida em homens idosos (HAK et al., 2002;

VAN DEN BELD et al., 2003). Por outro lado, doses supra fisiológicas de testosterona estão associadas ao desenvolvimento da hipertrofia ventricular esquerda e insuficiência cardíaca (FERRERA et al., 1997).

Nos últimos anos, têm sido descritas ações da testosterona sobre a proliferação celular e mediadores do processo inflamatório, eventos importantes que podem contribuir para as alterações funcionais e estruturais presentes em doenças cardiovasculares, como hipertensão arterial, pré-eclâmpsia e aterosclerose. Em relação aos efeitos da testosterona sobre a proliferação celular, podemos mencionar que tanto a testosterona como a DHT estimulam a proliferação de CMLV (KOLODGIE et al., 1996) (AKISHITA et al., 1997) e de células endoteliais em cultura (WILLIAMS et al., 2004). Efeitos pró-apoptóticos para a testosterona também foram descritos em células endoteliais privadas de soro (LING et al., 2002), em coração isolado (WANG et al., 2005) e em células da musculatura lisa vascular da artéria coronária de porcos (BOWLES et al., 2007).

Muitos agentes vasoativos e moléculas de sinalização participam dos processos hipertensivo, inflamatório e apoptótico mencionados acima. Cada vez mais temos evidências que as espécies reativas de oxigênio (EROs) têm papel na fisiologia e fisiopatologia vascular. A seguir, discutiremos a sua geração e importância nesse contexto.

1.3 Espécies Reativas de Oxigênio

As EROs são formadas continuamente durante o metabolismo celular. Em células de mamíferos, as principais fontes das EROs são a cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, as enzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase), xantina oxidase e óxido nítrico sintase (NOS). Fontes enzimáticas secundárias como a ciclooxigenase e a lipooxigenase, também podem contribuir para a formação de EROs nesses tipos celulares (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Muitas são as EROs formadas no organismo, dentre elas estão o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila ($\cdot OH$), o óxido nítrico ($\cdot NO$), o peroxinitrito ($ONOO^-$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O $O_2^{\cdot-}$, formado pela redução de um elétron do oxigênio molecular por enzimas como a NADPH oxidase, pode modular vias de sinalização intracelulares, mas pode também gerar outras EROs. Por exemplo, o $O_2^{\cdot-}$ pode reagir com o $\cdot NO$ levando a formação de $ONOO^-$. Por outro lado, o $O_2^{\cdot-}$ pode ser dismutado a H_2O_2 pela superóxido dismutase (SOD). Posteriormente, o H_2O_2 pode ser transformado em água e metabólitos secundários pela ação da catalase, da glutathiona peroxidase ou de peroxiredoxinas (DROGE, 2002). Na presença de metais de transição, o H_2O_2 pode ser convertido a $\cdot OH$ (CHANCE et al., 1979) (Figura 4).

Figura 4. Esquema representativo da síntese e metabolismo de EROs.

As EROs participam de reações em cadeia, transmitindo sinais a partir do seu ponto de formação para sítios relativamente distantes através de reações que envolvem muitas vezes o processo de transferência de elétrons (CUZZOCREA et al., 2001). Fisiologicamente, as EROs modulam vias de sinalização celular modificando resíduos de aminoácidos específicos ou grupamentos heme em proteínas (LYLE e

GRIENDLING, 2006). Cada ERO tem um mecanismo de ação específico, por exemplo, o $O_2^{\cdot -}$ reage com centros Fe-S de moléculas contendo heme, resultando na alteração de sua função. Por outro lado, o H_2O_2 pode por sua vez, oxidar resíduos de cisteína em proteínas, permitindo efeitos específicos das EROs. Modificações oxidativas reversíveis regulam a atividade de proteínas tirosina fosfatases, peroxiredoxinas e fatores de transcrição (FORMAN et al., 2004; WOLIN, 2000).

O estresse oxidativo é caracterizado por desequilíbrio e rotura da sinalização e controle redox (JONES, 2006). Durante o estresse oxidativo ocorre atividade aumentada das EROs que reagem diretamente com macromoléculas biológicas, como DNA, RNA, proteínas, carboidratos, esteróides e lipídeos, promovendo dano celular (VAZIRI et al., 2000). O aumento da atividade das EROs interfere em mecanismos de sinalização intracelular, ativando fatores de transcrição sensíveis às reações de oxirredução, como por exemplo o fator nuclear *kappa* B (NFkB: *nuclear factor kappa-B*) e o fator ativador de proteína-1 (AP-1: *activator protein-1*).

No sistema cardiovascular, as EROs são produzidas em pequenas concentrações agindo como moléculas sinalizadoras regulando o tônus, o crescimento (RAO e BERK, 1992) e a diferenciação (GRIENDLING et al., 2000) das CMLV, atuando fisiologicamente na manutenção da integridade cardíaca e vascular. Adicionalmente, as EROs atuam como moduladores de processos patológicos (GRIENDLING et al., 2000) como hipertensão, diabetes, aterosclerose e insuficiência cardíaca congestiva (LANDMESSER e HARRISON, 2001; NABHA et al., 2005; ZALBA et al., 2001) podendo levar a disfunção endotelial, aumento da contratilidade vascular, crescimento e apoptose de CMLV, lipoperoxidação e aumento da deposição de proteínas da matriz extracelular (RAO e BERK, 1992).

Nos últimos anos, o complexo enzimático NADPH oxidase tem sido considerado a principal fonte de geração das EROs na vasculatura (TOUYZ e SCHIFFRIN, 2004). Esta enzima está constitutivamente ativa em todas as camadas da parede vascular, gerando EROs intracelularmente de forma lenta e contínua (LI e SHAH, 2002) em resposta a um determinado agente (GRIENDLING et al., 2000). Em vasos sanguíneos, células residentes, não vasculares, como neutrófilos, macrófagos, e plaquetas, também

expressam NADPH oxidase e contribuem, portanto, para a geração de EROs vascular. Muitos fatores atuam na modulação desta enzima, entre eles fatores humorais (citocinas, fatores de crescimento e agentes vasoativos) e fatores físicos (estiramento, tensão de cisalhamento) (LASSEGUE e CLEMPUS, 2003).

As NADPH oxidases vasculares diferem estruturalmente (homologia) e bioquimicamente (cinética de ativação, regulação) (LASSEGUE e CLEMPUS, 2003) da NADPH oxidase fagocítica, a primeira descrita, ativa em processos de defesa do hospedeiro (GRIENDLING et al., 2000). Ao contrário das NADPH oxidases vasculares, o complexo enzimático NADPH oxidase de fagócitos, produz grandes quantidades de EROs de maneira induzível e para um compartimento externo, o fagossoma. A indução ocorre pela presença de agentes bacterianos ou citocinas, o que resulta na geração de ânion superóxido em grandes quantidades, o chamado *burst* oxidativo. A forma clássica desta enzima, presente no fagócito, possui subunidades localizadas no citoplasma celular (p47phox, p67phox, p40phox e Rac2) e subunidades localizadas na membrana celular (gp91phox e p22phox, que formam o flavocitocromo *b₅₅₈*) (GEISZT, 2006).

A ativação da NADPH oxidase fagocítica é um processo de várias etapas. Esse processo inicia-se pela fosforilação de um resíduo de serina da p47phox, desencadeando a formação de um complexo das subunidades citoplasmáticas, o qual é translocado para a membrana, aonde se associa ao flavocitocromo *b₅₅₈*, constituindo assim, a enzima na forma ativa (BABIOR et al., 2002; DELEO e QUINN, 1996).

Por muitos anos, sabia-se somente que células não fagocíticas, como por exemplo, células vasculares, também eram capazes de produzir EROs. No entanto, os mecanismos enzimáticos envolvidos nesta geração eram totalmente desconhecidos. Foi a descoberta da existência de homólogos da gp91phox que abriu caminhos para a melhor compreensão da produção de EROs em células não fagocíticas (GEISZT, 2006).

Os homólogos da gp91phox são designados a família Nox (Nox1, Nox2- antes conhecido como gp91phox-, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 e Duox2). Todas as Nox transportam elétrons através de membranas biológicas para reduzir oxigênio a $O_2^{\cdot-}$, e possuem propriedades estruturais conservadas que incluem: um sítio de ligação para

NADPH e um sítio de ligação para FAD, localizados na porção carboxi-terminal; seis domínios transmembrana e quatro histidinas como sítios de ligação para moléculas de heme (GEISZT, 2006).

A expressão desses homólogos varia com a espécie, o tecido e o tipo celular. Particularmente em células do sistema vascular, podem ser encontrados os homólogos Nox1 (CMLV), Nox2 (células endoteliais), Nox4 (CMLV) e Nox5 (células endoteliais e CMLV). Dentre os homólogos expressos em CMLV (Nox1, Nox4 e Nox5), apenas as Nox1 e Nox4 são expressas em ratos (GEISZT, 2006). Assim, nossos estudos foram direcionados para essas isoformas.

A Nox1 foi o primeiro homólogo a ser identificado (SUH et al., 1999). É constituída por 564 aminoácidos e possui 56% de identidade com a Nox2. Assim como a Nox2, possui seis segmentos transmembrana e domínios conservados que correspondem ao sítio de ligação para o heme, a flavina e o NADPH. Em CMLV, a Nox1 é expressa na membrana celular e colocaliza-se com a caveolina (HILENSKI et al., 2004). A atividade da Nox1 e, conseqüentemente, a produção de $O_2^{\cdot -}$ pela Nox1, é regulada pelas subunidades p47phox, p22phox (GEISZT, 2006).

A Nox4 foi primeiramente denominada Renox (do inglês, *renal oxidase*) por ser o homólogo mais expresso nos rins (GEISZT et al., 2000; SHIOSE et al., 2001). Constituída por 578 aminoácidos, apresenta 39% de homologia com a Nox2 e é expressa em regiões como as adesões focais, o retículo sarcoplasmático (HILENSKI et al., 2004) e o núcleo (PEDRUZZI et al., 2004).

A atividade enzimática da Nox4 foi descrita por Geiszt e colaboradores que demonstraram a produção constitutiva de $O_2^{\cdot -}$ em fibroblastos transfectados com Nox4. A Nox4 forma um complexo molecular ativo com a p22phox (AMBASTA et al., 2004; MARTYN et al., 2006). A produção de EROs pela Nox4 depende somente da p22phox, não sendo regulada pelas subunidades citosólicas da NADPH oxidase (MARTYN et al., 2006).

As diferenças entre os homólogos da Nox vão além da estrutura e localização celular. Estudos em modelos animais para reestenose mostram que a Nox1 e a Nox4 são ativadas em tempos diferentes, indicando mecanismo e cinética distintos de

ativação, o que pode estar relacionado com funções específicas no remodelamento vascular (BANFI et al., 2001). Por exemplo, a Nox1 tem sido associada a efeitos indutores de atividade mitogênica e crescimento celular, enquanto a Nox4 está relacionada à senescência celular (BANFI et al., 2003).

O processo de ativação Nox-específico pode envolver vias de sinalização distintas. Adicionalmente, agentes vasoativos como hormônios e fatores de crescimento, também podem modular especificamente as Nox (LASSEGUE et al., 2001; SUH et al., 1999).

Devido às importantes descobertas sobre as funções vasculares das Nox, pouco tem sido investigado sobre as ações das EROs derivadas da mitocôndria no sistema cardiovascular. As mitocôndrias são classicamente conhecidas como organelas produtoras de energia. No entanto, essas organelas participam de processos celulares fundamentais como a regulação da concentração de Ca^{2+} intracelular (DUSZYNSKI et al., 2006), sinalização pelo H_2O_2 (BROOKES et al., 2002) e modulação da apoptose (BROOKES et al., 2000), sendo portanto, organelas que recebem, integram e transmitem sinais, tendo papel crucial na resposta celular a uma variedade de estímulos (GOLDENTHAL e MARIN-GARCIA, 2004). Desta maneira, é impossível ignorar o fato de que tais organelas podem contribuir para o estresse oxidativo vascular.

Na cadeia de transporte de elétrons, dois complexos podem ser considerados fundamentais na geração do $\text{O}_2^{\cdot-}$ na mitocôndria, sendo eles os complexos I (NADH desidrogenase) e III (ubiquinona-citocromo c oxidorreductase) (BRAND et al., 2004). Os mecanismos envolvidos nessa geração ainda não estão totalmente esclarecidos, principalmente no complexo I no qual o sítio de produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$, a seqüência exata de transferência de elétrons e o acoplamento desta com o gradiente de prótons ainda não foram perfeitamente descritos (DEGLI e GHELLI, 1994). Por outro lado, já foi demonstrado que a produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ no complexo III envolve a redução de um elétron do radical semiubiquinona ($\text{UQ}^{\cdot-}$) resultando na geração do $\text{O}_2^{\cdot-}$. Neste complexo, a transferência de elétrons do ubiquinol (UQH_2) para o citocromo c é catalisada pelo ciclo Q (CROFTS, 2004), no qual o ubiquinol se difunde da membrana para seu sítio de ligação (Q_0) ocorrendo transferência do primeiro elétron para a proteína Rieske (que

passa o mesmo para o cit c1 e posteriormente para o cit c), o que resulta na liberação de dois íons hidrogênio e a formação do radical semiubiquinona. Em condições normais este radical é rapidamente convertido a UQ. O radical $UQ^{\cdot-}$ pode reagir com o oxigênio dissolvido na membrana da mitocôndria, produzindo $O_2^{\cdot-}$, especialmente em condições em que o fluxo de elétrons está reduzido (JEZEK e HLAVATA, 2005).

Uma característica bastante interessante é que a geração de $O_2^{\cdot-}$ pela cadeia de transporte de elétrons *in vitro* é sensível à força próton-motora (composta pelos gradientes de potencial e de concentração) na mitocôndria. A diminuição desta força tende a oxidar ciclo Q e diminuir o fornecimento de elétrons no complexo I, diminuindo a produção de $O_2^{\cdot-}$ (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Com relação aos efeitos da testosterona sobre a geração de EROs, já foi demonstrado que a testosterona diminui os níveis de vitamina E e a atividade da glutathione peroxidase, enquanto aumenta os níveis de malondialdeído, aumentando o estresse oxidativo em testículo de coelhos (AYDILEK et al., 2004). Por outro lado, outros estudos descrevem que, na próstata de ratos, a castração induz o estresse oxidativo, tanto pelo aumento da expressão das subunidades da NADPH oxidase como pela diminuição da expressão de enzimas anti-oxidantes, sendo que o tratamento com testosterona inibe este efeito (TAM et al., 2003). Adicionalmente, o tratamento com testosterona diminui a geração de $O_2^{\cdot-}$ em neutrófilos humanos (BEKESI et al., 2000). Não encontramos na literatura referências sobre a modulação da geração de EROs pela testosterona em CMLV em cultura.

Como mencionado anteriormente, as EROs podem levar a ativação de diferentes vias de sinalização. A sinalização redox pode ser definida como a modulação da atividade protéica por reações de oxidação e redução e tem sido reconhecida como um dos mecanismos fisiológicos mais importantes no controle da atividade celular (SCHOONBROODT e PIETTE, 2000). No sistema vascular as EROs agem como moléculas sinalizadoras regulando o tônus e crescimento das CMLV (RAO e BERK, 1992) atuando na manutenção da integridade cardíaca e vascular. Em condições de estresse oxidativo, as EROs podem levar a disfunção endotelial, aumento da contratilidade vascular, crescimento e apoptose de CMLV, lipoperoxidação e aumento

da deposição de proteínas da matriz extracelular (RAO e BERK, 1992). Dessa forma, descreveremos a seguir, algumas vias de sinalização e efeitos celulares modulados pela EROs.

1.4 Vias de sinalização redox

1.4.1 Proteínas quinases

As MAPKs são uma família de quinases serina/treonina associadas a muitas cascatas de sinalização relacionadas à modulação da proliferação, diferenciação e morte celular. A ativação das MAPKs depende de uma série de eventos de fosforilação, o que possibilita a interação de diferentes vias de sinalização e amplificação do sinal. Dentre os fatores que ativam as MAPKs podemos citar angiotensina II (Ang II), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PGDF) e também EROs (PARAVICINI e TOUYZ, 2006).

Além das MAPKs, outras quinases também podem ser ativadas por EROs como, por exemplo, as proteínas tirosina-quinases. Estas proteínas podem ser divididas em dois grupos:

1. Proteínas tirosina-quinases que são receptores, como por exemplo, o receptor para fator de crescimento epidermal (EGFR) e o receptor-h para o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR-h)
2. Proteínas tirosina-quinases que não são receptores, como por exemplo, a família da tirosina-quinase Src.

É de grande relevância enfatizar que a geração de EROs pode ocorrer tanto antes como após a ativação das MAPKs e de proteínas tirosina-quinases, isto é, a formação de EROs pode resultar da ativação dessas quinases mas pode também levar a fosforilação das mesmas, ativando-as. Por exemplo, em CMLV a ativação da p38MAPK é dependente de H_2O_2 (USHIO-FUKAI et al., 1998) enquanto que em

fibroblastos estimulados com busulfan (agente alquilante) ocorre fosforilação da ERK1/2 e da p38MAPK via $O_2^{\cdot -}$ gerado pela NADPH oxidase (PROBIN et al., 2007). A p38MAPK é um importante mediador do crescimento de CMLV (PARAVICINI e TOUYZ, 2006) da deposição de colágeno na hipertensão (TOUYZ et al., 2001) e pode contribuir para a vasoconstrição induzida pela Ang II (MELOCHE et al., 2000). De modo geral a ativação da p38MAPK pode estar relacionada a alterações estruturais e funcionais presentes na hipertensão.

Com relação às proteínas tirosina-quinases, podemos citar a transativação do EGFR por H_2O_2 e Ang II via c-Src (CHEN et al., 2001). Por outro lado, a Src também está envolvida em via de sinalização após a ativação do EGFR uma vez que a inibição do EGFR atenua a fosforilação de c-Src e ERK1/2 (TOUYZ et al., 2002). Este duplo papel da Src também é observado na cascata de fosforilação responsável pela ativação da NADPH oxidase por Ang II em CMLV (SESHIAH et al., 2002). A c-Src regula a atividade da NADPH oxidase, pois estimula a fosforilação e translocação da p47phox (TOUYZ et al., 2003) e, por outro lado, é uma enzima redox, suscetível à ativação por EROs.

Crescentes evidências sugerem que a testosterona modula vias de sinalização intracelular. A via melhor descrita é a ativação da fosfolipase C com aumento dos níveis de diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato em células da musculatura esquelética (ESTRADA et al., 2003) e em osteoblastos de ratos (LIEBERHERR e GROSSE, 1994). Adicionalmente, a c-Src parece estar envolvida na síntese e ação dos andrógenos uma vez que a inibição da c-Src em células adrenais resulta em aumento da produção de DHEA e DHEAS (SIRIANNI et al., 2003). Posteriormente, foi demonstrado que a testosterona pode induzir a ativação da Src em LnCaP via RACK1 (*receptor for activated C kinase 1*) o que leva a fosforilação do resíduo de tirosina do receptor para andrógenos regulando sua atividade (KRAUS et al., 2006).

A ativação de ERK1/2 pela testosterona já foi demonstrada em células não vasculares como, por exemplo, neurônios hipocâmpais (NGUYEN et al., 2005), células de músculo esquelético (ESTRADA et al., 2003) e células tumorais de carcinoma de adrenal humanas (BROWN et al., 2001). Por outro lado, outros grupos demonstraram

que a testosterona não modula a atividade da ERK1/2 em tecido renal de ratos com doença autossômica dominante policística renal (NAGAO et al., 2005) e em neurônios cerebelares de ratos (WONG et al., 2003).

Estes dados nos indicam que existem fatores que modulam a ativação de vias de sinalização pela testosterona, como por exemplo, o tipo celular e/ou tecido em questão, bem como as condições daquele tecido (presença ou ausência de patologia).

1.5 Efeitos Celulares Mediados por EROs

As EROs modulam diferentes efeitos celulares como a migração, a apoptose, a proliferação e a senescência celulares. A migração das CMLV é um processo muito importante no remodelamento vascular que ocorre na hipertensão. Dessa forma, descreveremos alguns aspectos importantes sobre os mecanismos envolvidos neste processo.

1.5.1 Migração Celular

A movimentação celular é um dos processos mais difíceis de serem explicados molecularmente. Partes diferentes da célula mudam simultaneamente, e não há uma organela específica responsável por esse processo. A actina forma a base para a migração celular e para tanto, sofre muitas transformações conforme a célula se desloca, emitindo lamelipódios e filopódios, associando-se com contatos focais, formando fibras e assim por diante (ALBERTS, 2002).

O processo de migração celular pode ser dividido basicamente em três processos (ALBERTS, 2002).

1. Protrusão: protrusões na forma de lamelipódios e filopódios são emitidas pela parte frontal da célula. Um dos primeiros eventos para a migração é o estabelecimento de polaridade na célula, indicando o sentido no qual a célula migrará, o que permite a extensão do lamellipodia a partir membrana celular. A formação dessas protrusões é

promovida pela polimerização de uma cadeia de filamentos de actina e sua estabilização está relacionada à formação de complexos focais dentro das mesmas. (ALBERTS, 2002; LYLE e GRIENDLING, 2006).

2. Adesão: os filamentos de actina estabelecem conexão com o substrato via complexos focais (regiões na membrana onde receptores para integrina, filamentos de actina e outras proteínas se agrupam). Os receptores transmembrana para proteínas existentes na matriz extracelular conectam a membrana plasmática ao substrato. Além disso, os filamentos de actina no citoplasma interagem com domínios citoplasmáticos desses receptores por proteínas-ligantes a actina (LYLE e GRIENDLING, 2006).

3. Tração: o corpo celular se desloca para frente. Os complexos focais vão se fortalecendo em adesões focais que funcionam como pontos de tração à superfície na qual a célula migra. Para que o deslocamento celular seja efetuado, as adesões focais devem ser continuamente formadas e quebradas. Além do estabelecimento das adesões focais, é necessário que a célula gere força para iniciar a sua progressão. Já foi proposto que GTPases Cdc42 e Rho regulam as forças contráteis por modularem a fosforilação da cadeia leve de miosina (CLM). A fosforilação da CLM promove dimerização e interação com actina levando à contração. A Rho quinase, ativada por Rho e EROs, inibe a miosina fosfatase permitindo que a célula permaneça em estado contrátil (ALBERTS, 2002; LYLE e GRIENDLING, 2006).

Efeitos diretos e indiretos de proteínas sinalizadoras podem modular a migração celular *in vivo* durante resposta inflamatória ou resposta a dano celular. Nesse contexto, componentes da matriz extracelular, como por exemplo, a osteopontina, colágeno I, colágeno IV e laminina, induzem migração celular. Além disso, muitas quinases sinalizadoras interagem com adesões focais incluindo Src, quinase de adesão focal (FAK, *focal adhesion kinase*), quinase dependente de fosfoinosítídeo, MAPKs e PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase) (GERTHOFFER, 2007; GERTHOFFER, 2008; LYLE e GRIENDLING, 2006).

A migração de CMLV é fundamental para muitos processos fisiológicos como desenvolvimento embrionário, respostas inflamatórias e resposta a dano tecidual/celular. Diferentes agentes vasoativos podem levar à migração das CMLV e

vários são os fatores envolvidos neste processo, dentre eles, as EROs. Vários estudos já demonstraram a participação de EROs na migração de CMLV estimuladas por vários agonistas como fenilefrina (NISHIO e WATANABE, 1997; WANG et al., 2001), fator de crescimento vascular endotelial, trombina (WANG et al., 2004), entre outros.

Ainda não há estudos com relação às ações da testosterona sobre a migração de CMLV.

8 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nos permitem concluir que:

1. A testosterona é capaz de modular a geração de EROs e a ativação de vias de sinalização em células da musculatura lisa vascular de ratos Wistar, WKY e SHR, por mecanismos genômicos e não-genômicos.
2. A geração de EROs pela testosterona em CMLV depende da concentração, do tempo de estímulo e ocorre provavelmente por diferentes fontes.
3. Os mecanismos envolvidos nessa geração diferem em células de animais normotensos e hipertensos, sendo que a geração é mais rápida em CMLV-SHR, onde observamos papel fundamental da c-Src no processo hipertensivo.
4. As EROs formadas pelo estímulo da testosterona levam a efeitos biológicos importantes como a migração celular.
5. A testosterona induz um fenótipo hipertensivo em células de animais WKY. Esta afirmação é baseada no fato de que a testosterona aumenta a expressão de subunidades da NADPH oxidase, induz o estresse oxidativo e induz a migração celular em células de animais normotensos.
6. Em células de animais hipertensos, a testosterona regula fenômenos que contribuem para o processo hipertensivo, como a geração de EROs, ativação da NADPH oxidase e migração celular.

Nossos dados corroboram trabalhos que indicam que o estresse oxidativo e as EROs contribuem para o desenvolvimento e manutenção da hipertensão arterial, sendo o primeiro a demonstrar mecanismos específicos das ações da testosterona em células da musculatura lisa vascular (Figuras 34 e 35).

Portanto, no presente estudo caracterizamos os efeitos da testosterona sobre as espécies reativas de oxigênio, elucidamos algumas das vias de sinalização envolvidas

nas ações extra-gonadais dos andrógenos e demonstramos efeitos funcionais importantes da testosterona em CMLV. Nossos dados nos permitem compreender melhor os possíveis mecanismos envolvidos nas diferenças cardiovasculares relacionadas ao sexo

Figura 34. Figura representativa dos mecanismos envolvidos na migração celular induzida pela testosterona em CMLV-WKY.

Figura 35. Figura representativa dos mecanismos envolvidos na migração celular induzida pela testosterona em CMLV-SHR.

REFERÊNCIAS*

ADAMS, M. R.; WILLIAMS, J. K.; KAPLAN, J. R. Effects of androgens on coronary artery atherosclerosis and atherosclerosis-related impairment of vascular responsiveness. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 15, n. 5, p. 562-570, 1995.

AKISHITA, M.; OUCHI, Y.; MIYOSHI, H.; KOZAKI, K.; INOUE, S.; ISHIKAWA, M.; ETO, M.; TOBA, K.; ORIMO, H. Estrogen inhibits cuff-induced intimal thickening of rat femoral artery: effects on migration and proliferation of vascular smooth muscle cells. **Atherosclerosis**, v. 130, n. 1-2, p. 1-10, 1997.

ALBERTS, B. **Molecular biology of the cell**. New York: Garland Science, 2002.

ALEXANDERSEN, P.; HAARBO, J.; BYRJALSEN, I.; LAWAETZ, H.; CHRISTIANSEN, C. Natural androgens inhibit male atherosclerosis: a study in castrated, cholesterol-fed rabbits. **Circ. Res.**, v. 84, n. 7, p. 813-819, 1999.

AMBASTA, R. K.; KUMAR, P.; GRIENDLING, K. K.; SCHMIDT, H. H.; BUSSE, R.; BRANDES, R. P. Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 44, p. 45935-45941, 2004.

ASHTON, N.; BALMENT, R. J. Sexual dimorphism in renal function and hormonal status of New Zealand genetically hypertensive rats. **Acta Endocrinol.**, v. 124, n. 1, p. 91-97, 1991.

AYDILEK, N.; AKSAKAL, M.; KARAKILCIK, A. Z. Effects of testosterone and vitamin E on the antioxidant system in rabbit testis. **Andrologia**, v. 36, n. 5, p. 277-281, 2004.

BABIOR, B. M.; LAMBETH, J. D.; NAUSEEF, W. The neutrophil NADPH oxidase. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 397, n. 2, p. 342-344, 2002.

BACAKOVA, L.; KUNES, J. Gender differences in growth of vascular smooth muscle cells isolated from hypertensive and normotensive rats. **Clin. Exp. Hypertens.**, v. 22, n. 1, p. 33-44, 2000.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BAKER, M. A.; KRUTSKIKH, A.; CURRY, B. J.; HETHERINGTON, L.; AITKEN, R. J. Identification of cytochrome-b5 reductase as the enzyme responsible for NADH-

dependent lucigenin chemiluminescence in human spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v. 73, n. 2, p. 334-342, 2005.

BANFI, B.; CLARK, R. A.; STEGER, K.; KRAUSE, K. H. Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 6, p. 3510-3513, 2003.

BANFI, B.; MOLNAR, G.; MATURANA, A.; STEGER, K.; HEGEDUS, B.; DEMAUREX, N.; KRAUSE, K. H. A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 40, p. 37594-37601, 2001.

BARRETT-CONNOR, E. ; BUSH, T. L. Estrogen and coronary heart disease in women. **JAMA**, v. 265, n. 14, p. 1861-1867, 1991.

BASUROY, S.; BHATTACHARYA, S.; LEFFLER, C. W.; PARFENOVA, H. Nox4 NADPH oxidase mediates oxidative stress and apoptosis caused by TNF-alpha in cerebral vascular endothelial cells. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 296, n. 3, p. C422-C432, 2009.

BEKESI, G.; KAKUCS, R.; VARBIRO, S.; RACZ, K.; SPRINTZ, D.; FEHER, J.; SZEKACS, B. In vitro effects of different steroid hormones on superoxide anion production of human neutrophil granulocytes. **Steroids**, v. 65, n. 12, p. 889-894, 2000.

BENTEN, W. P.; LIEBERHERR, M.; GIESE, G.; WREHLKE, C.; STAMM, O.; SEKERIS, C. E.; MOSSMANN, H.; WUNDERLICH, F. Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells. **FASEB J.**, v. 13, n. 1, p. 123-133, 1999.

BENTEN, W. P.; LIEBERHERR, M.; SEKERIS, C. E.; WUNDERLICH, F. Testosterone induces Ca²⁺ influx via non-genomic surface receptors in activated T cells. **FEBS Lett.**, v. 407, n. 2, p. 211-214, 1997.

BERK, B. C. Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. **Physiol. Rev.**, v. 81, n. 3, p. 999-1030, 2001.

BERN, M. M.; DRISCOLL, S. G.; LEAVITT, T., JR. Thrombocytopenia complicating preeclampsia: data to support a new model. **Obstet. Gynecol.**, v. 57, p. 28S-33S, 1981. Suppl. 6.

BOWLES, D. K.; MADDALI, K. K.; DHULIPALA, V. C.; KORZICK, D. H. PKCdelta mediates anti-proliferative, pro-apoptic effects of testosterone on coronary smooth muscle. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 293, n. 2, p. C805-C813, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAND, M. D.; AFFOURTIT, C.; ESTEVES, T. C.; GREEN, K.; LAMBERT, A. J.; MIWA, S.; PAKAY, J. L.; PARKER, N. Mitochondrial superoxide: production, biological effects,

and activation of uncoupling proteins. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 37, n. 6, p. 755-767, 2004.

BROOKES, P. S.; LEVONEN, A. L.; SHIVA, S.; SARTI, P.; RLEY-USMAR, V. M. Mitochondria: regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 33, n. 6, p. 755-764, 2002.

BROOKES, P. S.; SALINAS, E. P.; RLEY-USMAR, K.; EISERICH, J. P.; FREEMAN, B. A.; RLEY-USMAR, V. M.; ANDERSON, P. G. Concentration-dependent effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome c release. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 27, p. 20474-20479, 2000.

BROWN, J. W.; KESLER, C. T.; NEARY, T.; FISHMAN, L. M. Effects of androgens and estrogens and catechol and methoxy-estrogen derivatives on mitogen-activated protein kinase (ERK(1,2)) activity in SW-13 human adrenal carcinoma cells. **Horm. Metab. Res.**, v. 33, n. 3, p. 127-130, 2001.

BROWN, M. J. The causes of essential hypertension. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 42, n. 1, p. 21-27, 1996.

BRUCK, B.; BREHME, U.; GUGEL, N.; HANKE, S.; FINKING, G.; LUTZ, C.; BENDA, N.; SCHMAHL, F. W.; HAASIS, R.; HANKE, H. Gender-specific differences in the effects of testosterone and estrogen on the development of atherosclerosis in rabbits. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 17, n. 10, p. 2192-2199, 1997.

BURGER, H. G. Androgen production in women. **Fertil. Steril.**, v. 77, p. S3-S5, 2002. Suppl. 4.

CARMONA-CUENCA, I.; RONCERO, C.; SANCHO, P.; CAJA, L.; FAUSTO, N.; FERNANDEZ, M.; FABREGAT, I. Upregulation of the NADPH oxidase NOX4 by TGF-beta in hepatocytes is required for its pro-apoptotic activity. **J. Hepatol.**, v. 49, n. 6, p. 965-976, 2008.

CAVASIN, M. A.; TAO, Z. Y.; YU, A. L.; YANG, X. P. Testosterone enhances early cardiac remodeling after myocardial infarction, causing rupture and degrading cardiac function. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 290, n. 5, p. H2043-H2050, 2006.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev.**, v. 59, n. 3, p. 527-605, 1979.

CHEN, K.; VITA, J. A.; BERK, B. C.; KEANEY, J. F., JR. c-Jun N-terminal kinase activation by hydrogen peroxide in endothelial cells involves SRC-dependent epidermal growth factor receptor transactivation. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 19, p. 16045-16050, 2001.

CHENG, J.; WATKINS, S. C.; WALKER, W. H. Testosterone activates mitogen-activated protein kinase via Src kinase and the epidermal growth factor receptor in sertoli cells. **Endocrinology**, v. 148, n. 5, p. 2066-2074, 2007.

CROFTON, J. T.; OTA, M.; SHARE, L. Role of vasopressin, the renin-angiotensin system and sex in Dahl salt-sensitive hypertension. **J. Hypertens.**, v. 11, n. 10, p. 1031-1038, 1993.

CROFTS, A. R. The Q-cycle - A Personal Perspective. **Photosynth. Res.**, v. 80, n. 1-3, p. 223-243, 2004.

CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; DUGO, L.; CAPUTI, A. P.; ASTON, K.; RILEY, D. P.; SALVEMINI, D. Protective effects of a new stable, highly active SOD mimetic, M40401 in splanchnic artery occlusion and reperfusion. **Br. J. Pharmacol.**, v. 132, n. 1, p. 19-29, 2001.

DANTAS, A. P.; FRANCO, M. C.; SILVA-ANTONIALLI, M. M.; TOSTES, R. C.; FORTES, Z. B.; NIGRO, D.; CARVALHO, M. H. Gender differences in superoxide generation in microvessels of hypertensive rats: role of NAD(P)H-oxidase. **Cardiovasc. Res.**, v. 61, n. 1, p. 22-29, 2004.

DANTAS, A. P.; TOSTES, R. C.; FORTES, Z. B.; COSTA, S. G.; NIGRO, D.; CARVALHO, M. H. In vivo evidence for antioxidant potential of estrogen in microvessels of female spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 39, n. 2 Pt 2, p. 405-411, 2002.

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

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

DEGLI, E. M.; GHELLI, A. The mechanism of proton and electron transport in mitochondrial complex I. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1187, n. 2, p. 116-120, 1994.

DELEO, F. R.; QUINN, M. T. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. **J. Leukoc. Biol.**, v. 60, n. 6, p. 677-691, 1996.

DÓREA, E.; LOTUFO, P. Epidemiologia da Hipertensão Arterial no Brasil. In: BRANDÃO, A. A., AMODEO, C., NOBRE, F. e FUCHS, F. D. **Hipertensão**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 3-13.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

DUSZYNSKI, J.; KOZIEL, R.; BRUTKOWSKI, W.; SZCZEPANOWSKA, J.; ZABLOCKI, K. The regulatory role of mitochondria in capacitative calcium entry. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1757, n. 5-6, p. 380-387, 2006.

EL-ALFY, M.; LUU-THE, V.; HUANG, X. F.; BERGER, L.; LABRIE, F.; PELLETIER, G. Localization of type 5 17β -hydroxysteroid dehydrogenase, 3β -hydroxysteroid dehydrogenase, and androgen receptor in the human prostate by in situ hybridization and immunocytochemistry. **Endocrinology**, v. 140, n. 3, p. 1481-1491, 1999.

ESTRADA, M.; ESPINOSA, A.; MULLER, M.; JAIMOVICH, E. Testosterone stimulates intracellular calcium release and mitogen-activated protein kinases via a G protein-coupled receptor in skeletal muscle cells. **Endocrinology**, v. 144, n. 8, p. 3586-3597, 2003.

FERRERA, P. C.; PUTNAM, D. L.; VERDILE, V. P. Anabolic steroid use as the possible precipitant of dilated cardiomyopathy. **Cardiology**, v. 88, n. 2, p. 218-220, 1997.

FORMAN, H. J.; FUKUTO, J. M.; TORRES, M. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 287, n. 2, p. C246-C256, 2004.

GAO, W.; BOHL, C. E.; DALTON, J. T. Chemistry and structural biology of androgen receptor. **Chem. Rev.**, v. 105, n. 9, p. 3352-3370, 2005.

GEISZT, M. NADPH oxidases: new kids on the block. **Cardiovasc. Res.**, v. 71, n. 2, p. 289-299, 2006.

GEISZT, M.; KOPP, J. B.; VARNAI, P.; LETO, T. L. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 97, n. 14, p. 8010-8014, 2000.

GERTHOFFER, W. T. Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration. **Circ. Res.**, v. 100, n. 5, p. 607-621, 2007.

GERTHOFFER, W. T. Migration of airway smooth muscle cells. **Proc. Am. Thorac. Soc.**, v. 5, n. 1, p. 97-105, 2008.

GOLDENTHAL, M. J.; MARIN-GARCIA, J. Mitochondrial signaling pathways: a receiver/integrator organelle. **Mol. Cell Biochem.**, v. 262, n. 1-2, p. 1-16, 2004.

GRIENDLING, K. K.; SORESCU, D.; USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **Circ. Res.**, v. 86, n. 5, p. 494-501, 2000.

HAK, A. E.; WITTEMAN, J. C.; DE JONG, F. H.; GEERLINGS, M. I.; HOFMAN, A.; POLS, H. A. Low levels of endogenous androgens increase the risk of atherosclerosis in elderly men: the Rotterdam study. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 87, n. 8, p. 3632-3639, 2002.

HALLIWELL, B. e GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Clarendon Press, 2007

HANKE, H.; LENZ, C.; HESS, B.; SPINDLER, K. D.; WEIDEMANN, W. Effect of testosterone on plaque development and androgen receptor expression in the arterial vessel wall. **Circulation**, v. 103, n. 10, p. 1382-1385, 2001.

HARRAP, S. B. Hypertension: genes versus environment. **Lancet**, v. 344, n. 8916, p. 169-171, 1994.

HEINLEIN, C. A.; CHANG, C. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. **Mol. Endocrinol.**, v. 16, n. 10, p. 2181-2187, 2002.

HEUMULLER, S.; WIND, S.; BARBOSA-SICARD, E.; SCHMIDT, H. H.; BUSSE, R.; SCHRODER, K.; BRANDES, R. P. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. **Hypertension**, v. 51, n. 2, p. 211-217, 2008.

HILENSKI, L. L.; CLEMPUS, R. E.; QUINN, M. T.; LAMBETH, J. D.; GRIENDLING, K. K. Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 24, n. 4, p. 677-683, 2004.

HIMMELMANN, A.; SVENSSON, A.; HANSSON, L. Influence of sex on blood pressure and left ventricular mass in adolescents: the Hypertension in Pregnancy Offspring Study. **J. Hum. Hypertens.**, v. 8, n. 7, p. 485-490, 1994.

HSIEH, C. C.; LAU, Y. Migration of vascular smooth muscle cells is enhanced in cultures derived from spontaneously hypertensive rat. **Pflugers Arch.**, v. 435, n. 2, p. 286-292, 1998.

INTENGAN, H. D.; DENG, L. Y.; LI, J. S.; SCHIFFRIN, E. L. Mechanics and composition of human subcutaneous resistance arteries in essential hypertension. **Hypertension**, v. 33, n. 1 Pt 2, p. 569-574, 1999.

INTENGAN, H. D.; SCHIFFRIN, E. L. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. **Hypertension**, v. 36, n. 3, p. 312-318, 2000.

INTENGAN, H. D.; THIBAUT, G.; LI, J. S.; SCHIFFRIN, E. L. Resistance artery mechanics, structure, and extracellular components in spontaneously hypertensive rats : effects of angiotensin receptor antagonism and converting enzyme inhibition. **Circulation**, v. 100, n. 22, p. 2267-2275, 1999.

JANISZEWSKI, M.; LOPES, L. R.; CARMO, A. O.; PEDRO, M. A.; BRANDES, R. P.; SANTOS, C. X.; LAURINDO, F. R. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 49, p. 40813-40819, 2005.

JEZEK, P.; HLAVATA, L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 37, n. 12, p. 2478-2503, 2005.

JOHNSON, D. K.; SCHILLINGER, K. J.; KWAIT, D. M.; HUGHES, C. V.; MCNAMARA, E. J.; ISHMAEL, F.; O'DONNELL, R. W.; CHANG, M. M.; HOGG, M. G.; DORDICK, J. S.; SANTHANAM, L.; ZIEGLER, L. M.; HOLLAND, J. A. Inhibition of NADPH oxidase activation in endothelial cells by ortho-methoxy-substituted catechols. **Endothelium**, v. 9, n. 3, p. 191-203, 2002.

JONES, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxid. Redox. Signal.**, v. 8, n. 9-10, p. 1865-1879, 2006.

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

JUDD, H. L.; JUDD, G. E.; LUCAS, W. E.; YEN, S. S. Endocrine function of the postmenopausal ovary: concentration of androgens and estrogens in ovarian and peripheral vein blood. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 39, n. 6, p. 1020-1024, 1974.

KAHLES, T.; LUEDIKE, P.; ENDRES, M.; GALLA, H. J.; STEINMETZ, H.; BUSSE, R.; NEUMANN-HAEFELIN, T.; BRANDES, R. P. NADPH oxidase plays a central role in blood-brain barrier damage in experimental stroke. **Stroke**, v. 38, n. 11, p. 3000-3006, 2007.

KEARNEY, P. M.; WHELTON, M.; REYNOLDS, K.; MUNTNER, P.; WHELTON, P. K.; HE, J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. **Lancet**, v. 365, n. 9455, p. 217-223, 2005.

KOLODZIE, F. D.; JACOB, A.; WILSON, P. S.; CARLSON, G. C.; FARB, A.; VERMA, A.; VIRMANI, R. Estradiol attenuates directed migration of vascular smooth muscle cells in vitro. **Am. J. Pathol.**, v. 148, n. 3, p. 969-976, 1996.

KRAUS, S.; GIOELI, D.; VOMASTEK, T.; GORDON, V.; WEBER, M. J. Receptor for activated C kinase 1 (RACK1) and Src regulate the tyrosine phosphorylation and function of the androgen receptor. **Cancer Res.**, v. 66, n. 22, p. 11047-11054, 2006.

KRIEGER, J. E.; PEREIRA, A. C. Genética da Hipertensão Arterial. In: BRANDÃO, A.; AMODEO, C.; NOBRE, F.; FUCHS, F. **Hipertensão**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 17-24.

LANDMESSER, U.; HARRISON, D. G. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. **Coron. Artery Dis.**, v. 12, n. 6, p. 455-461, 2001.

LARSEN, B. A.; NORDESTGAARD, B. G.; STENDER, S.; KJELDSEN, K. Effect of testosterone on atherogenesis in cholesterol-fed rabbits with similar plasma cholesterol levels. **Atherosclerosis**, v. 99, n. 1, p. 79-86, 1993.

LASSEQUE, B; CLEMPUS, R. E. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 285, n. 2, p. R277-R297, 2003.

LASSEQUE, B.; SORESCU, D.; SZOCS, K.; YIN, Q.; AKERS, M.; ZHANG, Y.; GRANT, S. L.; LAMBETH, J. D.; GRIENDLING, K. K. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. **Circ. Res.**, v. 88, n. 9, p. 888-894, 2001.

LI, J. M.; SHAH, A. M. Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 22, p. 19952-19960, 2002.

LIEBERHERR, M.; GROSSE, B. Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol formation via a pertussis toxin-sensitive G-protein. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 10, p. 7217-7223, 1994.

LIN, A. L.; SCHULTZ, J. J.; BRENNER, R. M.; SHAIN, S. A. Sexual dimorphism characterizes baboon myocardial androgen receptors but not myocardial estrogen and progesterone receptors. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 37, n. 1, p. 85-95, 1990.

LING, S.; DAI, A.; WILLIAMS, M. R.; MYLES, K.; DILLEY, R. J.; KOMESAROFF, P. A.; SUDHIR, K. Testosterone (T) enhances apoptosis-related damage in human vascular endothelial cells. **Endocrinology**, v. 143, n. 3, p. 1119-1125, 2002.

LITTLETON-KEARNEY, M.; HURN, P. D. Testosterone as a modulator of vascular behavior. **Biol. Res. Nurs.**, v. 5, n. 4, p. 276-285, 2004.

LIU, P. Y.; DEATH, A. K.; HANDELSMAN, D. J. Androgens and cardiovascular disease. **Endocr. Rev.**, v. 24, n. 3, p. 313-340, 2003.

LUND-JOHANSEN, P. Haemodynamics in early essential hypertension--still an area of controversy. **J. Hypertens.**, v. 1, n. 3, p. 209-213, 1983.

LYLE, A. N.; GRIENDLING, K. K. Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. **Physiology**, v. 21, p. 269-280, 2006.

LYNG, F. M.; JONES, G. R.; ROMMERTS, F. F. Rapid androgen actions on calcium signaling in rat sertoli cells and two human prostatic cell lines: similar biphasic responses between 1 picomolar and 100 nanomolar concentrations. **Biol. Reprod.**, v. 63, n. 3, p. 736-747, 2000.

MACMAHON, S.; PETO, R.; CUTLER, J.; COLLINS, R.; SORLIE, P.; NEATON, J.; ABBOTT, R.; GODWIN, J.; DYER, A.; STAMLER, J. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1, Prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. **Lancet**, v. 335, n. 8692, p. 765-774, 1990.

MARTYN, K. D.; FREDERICK, L. M.; VON, L. K.; DINAUER, M. C.; KNAUS, U. G. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. **Cell Signal.**, v. 18, n. 1, p. 69-82, 2006.

MELOCHE, S.; LANDRY, J.; HUOT, J.; HOULE, F.; MARCEAU, F.; GIASSEN, E. p38 MAP kinase pathway regulates angiotensin II-induced contraction of rat vascular smooth muscle. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 279, n. 2, p. H741-H751, 2000.

MONTEZANO, A. C.; CALLERA, G. E.; MOTA, A. L.; FORTES, Z. B.; NIGRO, D.; CARVALHO, M. H.; ZORN, T. M.; TOSTES, R. C. Endothelin-1 contributes to the sexual differences in renal damage in DOCA-salt rats. **Peptides**, v. 26, n. 8, p. 1454-1462, 2005.

MULVANY, M. J. Small artery remodeling in hypertension. **Curr. Hypertens. Rep.**, v. 4, n. 1, p. 49-55, 2002.

NABHA, L.; GARBERN, J. C.; BULLER, C. L.; CHARPIE, J. R. Vascular oxidative stress precedes high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Clin. Exp. Hypertens.**, v. 27, n. 1, p. 71-82, 2005.

NAGAO, S.; KUSAKA, M.; NISHII, K.; MARUNOUCHI, T.; KURAHASHI, H.; TAKAHASHI, H.; GRANTHAM, J. Androgen receptor pathway in rats with autosomal dominant polycystic kidney disease. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 16, n. 7, p. 2052-2062, 2005.

NAKHLA, A. M.; KHAN, M. S.; ROSNER, W. Biologically active steroids activate receptor-bound human sex hormone-binding globulin to cause LNCaP cells to accumulate adenosine 3',5'-monophosphate. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 71, n. 2, p. 398-404, 1990.

NATHAN, L.; SHI, W.; DINH, H.; MUKHERJEE, T. K.; WANG, X.; LUSIS, A. J.; CHAUDHURI, G. Testosterone inhibits early atherogenesis by conversion to estradiol: critical role of aromatase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 98, n. 6, p. 3589-3593, 2001.

NGUYEN, T. V.; YAO, M.; PIKE, C. J. Androgens activate mitogen-activated protein kinase signaling: role in neuroprotection. **J. Neurochem.**, v. 94, n. 6, p. 1639-1651, 2005.

NISHIO, E.; WATANABE, Y. Homocysteine as a modulator of platelet-derived growth factor action in vascular smooth muscle cells: a possible role for hydrogen peroxide. **Br. J. Pharmacol.**, v. 122, n. 2, p. 269-274, 1997.

OUCHI, Y.; SHARE, L.; CROFTON, J. T.; IITAKE, K.; BROOKS, D. P. Sex difference in the development of deoxycorticosterone-salt hypertension in the rat. **Hypertension**, v. 9, n. 2, p. 172-177, 1987.

PARAVICINI, T. M.; TOUYZ, R. M. Redox signaling in hypertension. **Cardiovasc. Res.**, v. 71, n. 2, p. 247-258, 2006.

PEARLSTEIN, D. P.; ALI, M. H.; MUNGAI, P. T.; HYNES, K. L.; GEWERTZ, B. L.; SCHUMACKER, P. T. Role of mitochondrial oxidant generation in endothelial cell responses to hypoxia. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 22, n. 4, p. 566-573, 2002.

PEDRAM, A.; RAZANDI, M.; SAINSON, R. C.; KIM, J. K.; HUGHES, C. C.; LEVIN, E. R. A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 31, p. 22278-22288, 2007.

PEDRUZZI, E.; GUICHARD, C.; OLLIVIER, V.; DRISS, F.; FAY, M.; PRUNET, C.; MARIE, J. C.; POUZET, C.; SAMADI, M.; ELBIM, C.; O'DOWD, Y.; BENS, M.; VANDEWALLE, A.; GOUGEROT-POCIDALO, M. A.; LIZARD, G.; OGIER-DENIS, E. NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. **Mol. Cell Biol.**, v. 24, n. 24, p. 10703-10717, 2004.

PERRY, S. W.; NORMAN, J. P.; LITZBURG, A.; ZHANG, D.; DEWHURST, S.; GELBARD, H. A. HIV-1 transactivator of transcription protein induces mitochondrial hyperpolarization and synaptic stress leading to apoptosis. **J. Immunol.**, v. 174, n. 7, p. 4333-4344, 2005.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 29, n. 9, p. e452001.

PROBIN, V.; WANG, Y.; ZHOU, D. Busulfan-induced senescence is dependent on ROS production upstream of the MAPK pathway. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 42, n. 12, p. 1858-1865, 2007.

PUGH, P. J.; JONES, T. H.; CHANNER, K. S. Acute haemodynamic effects of testosterone in men with chronic heart failure. **Eur. Heart J.**, v. 24, n. 10, p. 909-915, 2003.

QIAO, X.; MCCONNELL, K. R.; KHALIL, R. A. Sex steroids and vascular responses in hypertension and aging. **Gend. Med.**, v. 5 Suppl A, p. S46-S64, 2008.

RANDO, T. A.; DISATNIK, M. H.; YU, Y.; FRANCO, A. Muscle cells from mdx mice have an increased susceptibility to oxidative stress. **Neuromuscul. Disord.**, v. 8, n. 1, p. 14-21, 1998.

RAO, G. N.; BERK, B. C. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. **Circ. Res.**, v. 70, n. 3, p. 593-599, 1992.

RECKELHOFF, J. F.; ZHANG, H.; GRANGER, J. P. Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 31, n. 1 Pt 2, p. 435-439, 1998.

RECKELHOFF, J. F.; ZHANG, H.; SRIVASTAVA, K. Gender differences in development of hypertension in spontaneously hypertensive rats: role of the renin-angiotensin system. **Hypertension**, v. 35, n. 1 Pt 2, p. 480-483, 2000.

SANJULIANI, A. F. Avaliação Clínica e Complementar do Paciente Hipertenso. In: BRANDÃO, A. A., AMODEO, C., NOBRE, F. e FUCHS, F. D. **Hipertensão**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 149-155.

SARREL, P. M. The differential effects of oestrogens and progestins on vascular tone. **Hum. Reprod. Update.**, v. 5, n. 3, p. 205-209, 1999.

SARREL, P. M. Hormone replacement therapy in the menopause. **Int. J. Fertil. Womens Med.**, v. 42, n. 2, p. 78-84, 1997.

SASAKI, H.; YAMAMOTO, H.; TOMINAGA, K.; MASUDA, K.; KAWAI, T.; TESHIMA-KONDO, S.; MATSUNO, K.; YABE-NISHIMURA, C.; ROKUTAN, K. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand-induced mouse osteoclast differentiation is associated with switching between NADPH oxidase homologues. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 47, n. 2, p. 189-199, 2009.

SCHIFFRIN, E. L. Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. **Am. J. Hypertens.**, v. 17, n. 12 Pt 1, p. 1192-1200, 2004.

SCHOONBROODT, S.; PIETTE, J. Oxidative stress interference with the nuclear factor-kappa B activation pathways. **Biochem. Pharmacol.**, v. 60, n. 8, p. 1075-1083, 2000.

SESHIAH, P. N.; WEBER, D. S.; ROCIC, P.; VALPPU, L.; TANIYAMA, Y.; GRIENDLING, K. K. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. **Circ. Res.**, v. 91, n. 5, p. 406-413, 2002.

SHIOSE, A.; KURODA, J.; TSURUYA, K.; HIRAI, M.; HIRAKATA, H.; NAITO, S.; HATTORI, M.; SAKAKI, Y.; SUMIMOTO, H. A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 2, p. 1417-1423, 2001.

SILVA-ANTONIALLI, M. M.; TOSTES, R. C.; FERNANDES, L.; FIOR-CHADI, D. R.; AKAMINE, E. H.; CARVALHO, M. H.; FORTES, Z. B.; NIGRO, D. A lower ratio of AT1/AT2 receptors of angiotensin II is found in female than in male spontaneously hypertensive rats. **Cardiovasc. Res.**, v. 62, n. 3, p. 587-593, 2004.

SINHA-HIKIM, I.; TAYLOR, W. E.; GONZALEZ-CADAVID, N. F.; ZHENG, W.; BHASIN, S. Androgen receptor in human skeletal muscle and cultured muscle satellite cells: up-regulation by androgen treatment. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 89, n. 10, p. 5245-5255, 2004.

SIRIANNI, R.; CARR, B. R.; ANDO, S.; RAINEY, W. E. Inhibition of Src tyrosine kinase stimulates adrenal androgen production. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 30, n. 3, p. 287-299, 2003.

STEINSAPIR, J.; SOCCI, R.; REINACH, P. Effects of androgen on intracellular calcium of LNCaP cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 179, n. 1, p. 90-96, 1991.

SUH, Y. A.; ARNOLD, R. S.; LASSEGUE, B.; SHI, J.; XU, X.; SORESCU, D.; CHUNG, A. B.; GRIENDLING, K. K.; LAMBETH, J. D. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. **Nature**, v. 401, n. 6748, p. 79-82, 1999.

SUN, Y. H.; GAO, X.; TANG, Y. J.; XU, C. L.; WANG, L. H. Androgens induce increases in intracellular calcium via a G protein-coupled receptor in LNCaP prostate cancer cells. **J. Androl.**, v. 27, n. 5, p. 671-678, 2006.

TAM, N. N.; GAO, Y.; LEUNG, Y. K.; HO, S. M. Androgenic regulation of oxidative stress in the rat prostate: involvement of NAD(P)H oxidases and antioxidant defense machinery during prostatic involution and regrowth. **Am. J. Pathol.**, v. 163, n. 6, p. 2513-2522, 2003.

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

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

TOUYZ, R. M.; CHEN, X.; TABET, F.; YAO, G.; HE, G.; QUINN, M. T.; PAGANO, P. J.; SCHIFFRIN, E. L. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. **Circ. Res.**, v. 90, n. 11, p. 1205-1213, 2002.

TOUYZ, R. M.; HE, G.; EL, M. M.; SCHIFFRIN, E. L. p38 Map kinase regulates vascular smooth muscle cell collagen synthesis by angiotensin II in SHR but not in WKY. **Hypertension**, v. 37, n. 2 Part 2, p. 574-580, 2001.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. **Histochem. Cell Biol.**, v. 122, n. 4, p. 339-352, 2004.

TOUYZ, R. M.; WU, X. H.; HE, G.; SALOMON, S.; SCHIFFRIN, E. L. Increased angiotensin II-mediated Src signaling via epidermal growth factor receptor transactivation is associated with decreased C-terminal Src kinase activity in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 39, n. 2 Pt 2, p. 479-485, 2002.

TOUYZ, R. M.; YAO, G.; SCHIFFRIN, E. L. c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox: role in superoxide generation by angiotensin II in human

vascular smooth muscle cells. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 23, n. 6, p. 981-987, 2003.

USHIO-FUKAI, M.; ALEXANDER, R. W.; AKERS, M.; GRIENDLING, K. K. p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 24, p. 15022-15029, 1998.

VAN DEN BELD, A. W.; BLUM, W. F.; POLS, H. A.; GROBBEE, D. E.; LAMBERTS, S. W. Serum insulin-like growth factor binding protein-2 levels as an indicator of functional ability in elderly men. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 148, n. 6, p. 627-634, 2003.

VAZIRI, N. D.; WANG, X. Q.; OVEISI, F.; RAD, B. Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats. **Hypertension**, v. 36, n. 1, p. 142-146, 2000.

VEJRAZKA, M.; MICEK, R.; STIPEK, S. Apocynin inhibits NADPH oxidase in phagocytes but stimulates ROS production in non-phagocytic cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1722, n. 2, p. 143-147, 2005.

VIRDIS, A.; NEVES, M. F.; AMIRI, F.; TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice. **J. Hypertens.**, v. 22, n. 3, p. 535-542, 2004.

WANG, M.; TSAI, B. M.; KHER, A.; BAKER, L. B.; WAIRIUKO, G. M.; MELDRUM, D. R. Role of endogenous testosterone in myocardial proinflammatory and proapoptotic signaling after acute ischemia-reperfusion. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 288, n. 1, p. H221-H226, 2005.

WANG, M.; TSAI, B. M.; KHER, A.; BAKER, L. B.; WAIRIUKO, G. M.; MELDRUM, D. R. Role of endogenous testosterone in myocardial proinflammatory and proapoptotic signaling after acute ischemia-reperfusion. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 288, n. 1, p. H221-H226, 2005.

WANG, Z.; CASTRESANA, M. R.; NEWMAN, W. H. Reactive oxygen and NF-kappaB in VEGF-induced migration of human vascular smooth muscle cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 285, n. 3, p. 669-674, 2001.

WANG, Z.; CASTRESANA, M. R.; NEWMAN, W. H. Reactive oxygen species-sensitive p38 MAPK controls thrombin-induced migration of vascular smooth muscle cells. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 36, n. 1, p. 49-56, 2004.

WHITAKER, H. C.; HANRAHAN, S.; TOTTY, N.; GAMBLE, S. C.; WAXMAN, J.; CATO, A. C.; HURST, H. C.; BEVAN, C. L. Androgen receptor is targeted to distinct subcellular compartments in response to different therapeutic antiandrogens. **Clin. Cancer Res.**, v. 10, n. 21, p. 7392-7401, 2004.

WILLIAMS, M. R.; DAWOOD, T.; LING, S.; DAI, A.; LEW, R.; MYLES, K.; FUNDER, J. W.; SUDHIR, K.; KOMESAROFF, P. A. Dehydroepiandrosterone increases endothelial cell proliferation in vitro and improves endothelial function in vivo by mechanisms independent of androgen and estrogen receptors. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 89, n. 9, p. 4708-4715, 2004.

WILSON, C. M.; MCPHAUL, M. J. A and B forms of the androgen receptor are expressed in a variety of human tissues. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 120, n. 1, p. 51-57, 1996.

WINTERS, S. J. Androgens and antiandrogens. In: BRODY TM, LARNER J e MINNEMAN KP **Human Pharmacology: molecular to clinics**. St Louis: Mosby, 1999. p. 519-531.

WOLIN, M. S. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 20, n. 6, p. 1430-1442, 2000.

WONG, J. K.; LE, H. H.; ZSARNOVSZKY, A.; BELCHER, S. M. Estrogens and ICI182,780 (Faslodex) modulate mitosis and cell death in immature cerebellar neurons via rapid activation of p44/p42 mitogen-activated protein kinase. **J. Neurosci.**, v. 23, n. 12, p. 4984-4995, 2003.

XIAO, Q.; LUO, Z.; PEPE, A. E.; MARGARITI, A.; ZENG, L.; XU, Q. Embryonic stem cell differentiation into smooth muscle cells is mediated by Nox4-produced H₂O₂. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 296, n. 4, p. C711-C723, 2009.

YONG, L. C.; KULLER, L. H.; RUTAN, G.; BUNKER, C. Longitudinal study of blood pressure: changes and determinants from adolescence to middle age. The Dormont High School follow-up study, 1957-1963 to 1989-1990. **Am. J. Epidemiol.**, v. 138, n. 11, p. 973-983, 1993.

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.

ZALBA, G.; SAN, J. G.; MORENO, M. U.; FORTUNO, M. A.; FORTUNO, A.; BEAUMONT, F. J.; DIEZ, J. Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. **Hypertension**, v. 38, n. 6, p. 1395-1399, 2001.

ZHAO, H.; JOSEPH, J.; FALES, H. M.; SOKOLOSKI, E. A.; LEVINE, R. L.; VASQUEZ-VIVAR, J.; KALYANARAMAN, B. Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 102, n. 16, p. 5727-5732, 2005.