

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Departamento de Fisiologia  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia

**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO REPRODUTIVA EM RATAS SUBMETIDAS AO  
CLAMPEAMENTO DA ARTÉRIA RENAL ESQUERDA  
MODELO 2 RINS/ 1 CLIPE**

**Dissertação de Mestrado**

**Rosane Aparecida Ribeiro**

PORTO ALEGRE – RS

2006

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Departamento de Fisiologia  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia

**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO REPRODUTIVA EM RATAS SUBMETIDAS AO  
CLAMPEAMENTO DA ARTÉRIA RENAL ESQUERDA  
MODELO 2 RINS/ 1 CLIPE**

**Rosane Aparecida Ribeiro**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Gilberto Luiz Sanvitto**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciências biológicas: Fisiologia, ICBS da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Fisiologia.

PORTO ALEGRE – RS

2006

*Aos meus pais.*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo dom da vida e por sempre me indicar a direção melhor que devo seguir, a Ele os meus mais nobres e sinceros agradecimentos.

Aos **meus pais**, que mesmo distante sempre estiveram presentes me incentivando nas dificuldades ou nos momentos em que pensei em desistir.

Ao professor **Dr. Gilberto Luiz Sanvitto**, pela orientação, incentivo e compreensão.

Ao professor **Dr. Aldo Bolten Lucion**, pelo auxílio e contribuições durante o desenvolvimento deste trabalho.

À **Cármem Gomes, Charlis Raineiki e Márcia Breigeiron** pelo auxílio teórico e prático.

À **Tatiane S. Cagol Camozzato, Ana Raquel Karkow, Caroline P. Veiga, Rosana Frey** por estarem presentes nas horas difíceis, me incentivando a continuar.

À **Elisa C. Winkelmann-Duarte e Adriano B. Duarte** por me receberem em sua casa, pela convivência harmoniosa, e pelo apoio durante o mestrado.

Ao aluno de iniciação científica **Osni Gonçalves**, pela eficiência com que colaborou com o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas de laboratório: **Camila Padilha, Fabiana de Sousa, Natália Uriarte, Gabriela Severino, Ana Lúcia Cecconello** que contribuíram com coleguismo nas mais diversas situações.

À bioterista **Ângela**, pelos cuidados com os animais.

Ao Laboratório de Fisiologia Cardiovascular por permitir o uso do aparelho para verificação da pressão arterial.

Ao professor **Dr. Celso R. Franci** e à **Sônia A. Zanon** e **Anelise Todeschini**, pelas dosagens hormonais, de importância para a complementação dos resultados obtidos neste estudo.

Às professoras **Sara C. Sagae**, **Sandra Lucinei Balbo**, **Maria Lúcia Bonfleur**, por acreditarem em mim, me direcionarem à pós-graduação e pelos conselhos importantes nos momentos difíceis.

Aos professores membros da banca examinadora **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ilma S. Brum**, **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cláudia Irigoyen** e **Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci** pela atenção e sugestões.

Ao CNPq, órgão que contribuiu com apoio financeiro.

À instituição: **UFRGS**, pela oportunidade de crescimento intelectual, profissional e também pessoal.

**SUMÁRIO**

<b>LISTAS DE FIGURAS</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>XIII</b>
<b>RESUMO</b>	<b>XIV</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1. HIPERTENSÃO	2
2. ANGIOTENSINA	3
2.1 Angiotensina II e pressão arterial	4
2.2 Modelo de Hipertensão Renovascular	6
3. FISILOGIA REPRODUTIVA	7
3.1 O Ciclo Estral da Rata	8
3.2 Comportamento Sexual da rata	12
3.3 Angiotensina e Função Reprodutiva	15
<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>18</b>
<b>OBJETIVO</b>	<b>20</b>
<b>EXPERIMENTO I</b>	<b>21</b>
1. Objetivos específicos	21
<b>EXPERIMENTO II</b>	<b>21</b>
2. Objetivos específicos	21

<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>22</b>
1. ANIMAIS	23
2. GRUPOS EXPERIMENTAIS	23
3. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	24
3.1 Hipertensão Renovascular - modelo de Goldblatt tipo I: 2 Rins/1 Clipe (2R/1C)	24
4. REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA	25
4.1 Pletismografia Caudal	25
<b>EXPERIMENTO I</b>	<b>26</b>
1. ANÁLISE DO CICLO ESTRAL	26
2. COMPORTAMENTO SEXUAL	29
2.1 Seleção de ratos machos sexualmente ativos	29
2.2 Seleção de fêmeas em Proestro e Registro Comportamental	30
3. CONTAGEM DO NÚMERO DE ÓVULOS	31
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
<b>EXPERIMENTO II</b>	<b>32</b>
1. CANULAÇÃO DA VEIA JUGULAR	33
2. DOSAGEM HORMONAL	33
3. PESO DOS OVÁRIOS E CONTAGEM DO NÚMERO DE ÓVULOS	34
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
<b>RESULTADOS</b>	<b>36</b>

1. CIRURGIA E CLAMPEAMENTO RENAL _____	37
1.1 Peso Corporal _____	37
1.2 Pressão Arterial Sistólica e Frequência Cardíaca _____	37
1.3 Peso Renal _____	37
1.4 Índice Renal _____	38
<b>EXPERIMENTO I _____</b>	<b>38</b>
1. CICLO ESTRAL _____	38
2. COMPORTAMENTO SEXUAL _____	39
2.1 Frequência de Lordoses _____	39
2.2 Frequência de Montas _____	39
2.3 Quociente de lordose (número de lordose/número de montas) _____	39
2.4 Frequência e Duração da Locomoção _____	39
3. CONTAGEM DO NÚMERO DE ÓVULOS _____	40
<b>EXPERIMENTO II _____</b>	<b>40</b>
1. PERFIL HORMONAL _____	40
1.1 Estradiol _____	40
1.2 LH _____	41
1.3 FSH _____	41
2. PESO DOS OVÁRIOS E CONTAGEM DO NÚMERO DE ÓVULOS _____	42
<b>DISCUSSÃO _____</b>	<b>60</b>
1. HIPERTENSÃO RENOVASCULAR _____	61

2. CICLO ESTRAL _____	63
3. COMPORTAMENTO SEXUAL _____	66
4. OVULAÇÃO _____	70
<b>CONCLUSÕES _____</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____</b>	<b>78</b>

## LISTAS DE FIGURAS

- Figura 01:** Variações hormonais nas diferentes fases do ciclo estral da rata (SMITH; FREEMAN; NEILL, 1975) .....11
- Figura 02:** Coleta do esfregaço vaginal para análise do ciclo estral .....27
- Figura 03:** Células coletadas por meio de esfregaço vaginal nas diferentes fases do ciclo estral da rata ..... 28
- Figura 04:** Peso corporal de ratas FICT, 2R/1C, 2R/1C-H. As barras indicam a média±EPM.  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).....43
- Figura 05:** (A) Pressão Arterial Sistólica (mmHg); e (B) Frequência Cardíaca ( $\text{bm}^{-1}$ ), de ratas FICT, 2R/1C, 2R/1C-H. As barras indicam a média±EPM. Letras diferentes indicam diferenças significativas,  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).....44
- Figura 06:** (A) Peso renal direito; e (B) Peso renal esquerdo, de ratas FICT, 2R/1C, 2R/1C-H. As barras indicam a média±EPM. Letras diferentes indicam diferenças significativas,  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).....45

**Figura 07:** (A) Índice renal direito; e (B) Índice renal esquerdo, de ratas FICT, 2R/1C, 2R/1C-H. As barras indicam a média±EPM. Letras diferentes indicam diferenças significativas,  $p<0,05$  (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).....46

**Figura 08:** (A) Tempo em dias (média±EPM) para o retorno a mudanças nas fases do ciclo estral, após cirurgia, em ratas FICT, 2R/1C, 2R/1C-H; e (B) Percentual de ratas FICT, 2R/1C, 2R/1C-H que retornaram ao ciclo estral regular após 15 dias da intervenção cirúrgica. Letras diferentes se referem à diferenças significativas,  $p<0,05$  (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls) .....47

**Figura 09:** (A) Número de lordoses em 15 minutos (média±EPM), apresentado por ratas FICT, 2R/1C e 2R/1C-H, em proestro, quando testadas com machos sexualmente ativos. (B) Número de montas do macho em 15 minutos (média±EPM) quando testados com fêmeas FICT, 2R/1C e 2R/1C-H, em proestro. As barras indicam a média±EPM. Letras diferentes indicam diferenças significativas,  $p<0,05$  (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).....48

**Figura 10:** Quociente de lordose (média±EPM) de ratas FICT, 2R/1C, 2R/1C-H, em proestro, quando testadas com machos sexualmente ativos. Letras diferentes indicam diferenças significativas,  $p<0,05$  (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).....49

**Figura 11:** (A) Média  $\pm$  EPM da frequência de locomoção; e (B) Média  $\pm$  EPM do percentual da duração de locomoção durante 15 minutos, apresentado por ratas FICT, 2R/1C, 2R/1C-H, em proestro, durante o registro do comportamento sexual (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).....50

**Figura 12:** Número de óvulos (média $\pm$ EPM) de ratas FICT, 2R/1C, 2R/1C-H, na fase estro. Letras diferentes se referem a diferenças significativas,  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).....51

**Figura 13:** Concentração plasmática de estradiol (pg/mL) na tarde do proestro (das 13:00 às 20:00h) em ratas FICT, 2R/1C, e 2R/1C-H.  $p < 0,05$  (ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguida de Newman-Keuls).....52

**Figura 14:** Média  $\pm$  EPM da área abaixo da curva das concentrações plasmáticas de estradiol durante a tarde do proestro (das 13:00 às 20:00h) de ratas FICT, 2R/1C, 2R/1C-H.  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).....53

**Figura 15:** Concentração plasmática de LH (ng/mL) na tarde do proestro (das 13:00 às 20:00h) em ratas FICT, 2R/1C, e 2R/1C-H. \* indica diferenças significativas,  $p < 0,05$  (ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguida de Newman-Keuls).....54

**Figura 16:** Média  $\pm$  EPM da área abaixo da curva das concentrações plasmáticas de LH durante a tarde do proestro (das 13:00 às 20:00h) de ratas FICT, 2R/1C, 2R/1C-H.  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).....55

**Figura 17:** Concentração plasmática de FSH (ng/mL) na tarde do proestro (das 13:00 às 20:00h) em ratas FICT, 2R/1C, e 2R/1C-H.  $p < 0,05$  (ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguida de Newman-Keuls).....56

**Figura 18:** Média  $\pm$  EPM da área abaixo da curva das concentrações plasmáticas de FSH durante a tarde do proestro (das 13:00 às 20:00h) de ratas FICT, 2R/1C, 2R/1C-H.  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).....57

**Figura 19:** (A) Peso do ovário direito; e (B) Peso do ovário esquerdo (média $\pm$ EPM), de ratas FICT, 2R/1C, 2R/1C-H, na fase estro.  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).....58

**Figura 20:** Número de óvulos (média $\pm$ EPM) de ratas FICT, 2R/1C, 2R/1C-H, na fase estro. Letras diferentes se referem a diferenças significativas,  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).....59

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**Ang II** - angiotensina II

**APOM** - área pré-óptica medial

**ASO** - sistema olfatório acessório

**FC** – frequência cardíaca

**FSH** – hormônio folículo estimulante

**icv** – intracerebroventricular

**LH** – hormônio luteinizante

**LHRH** – hormônio liberador do hormônio luteinizante

**MeA** – núcleo medial da amígdala

**MnPO** – núcleo pré-óptico mediano

**NTS** – núcleo trato solitário

**OCVs** - órgãos circumventriculares

**PAG** – substância cinzenta periaqueductal

**PAS** – pressão arterial sistólica

**PRL** – prolactina

**PVN** – núcleo paraventricular

**RNA<sub>m</sub>** – RNA mensageiro

**SNC** – sistema nervoso central

**SFO** – órgão subfornicial

**SRA** - sistema renina-angiotensina

**VMH** – núcleo ventromedial do hipotálamo

## RESUMO

No modelo de hipertensão renovascular, a redução do fluxo sanguíneo para o rim causada pela aplicação de um clipe na artéria renal, modelo 2 Rins/ 1 Clipe (2R/1C), leva à secreção de renina e um aumento secundário na concentração de angiotensina II (Ang II) periférica, que tem papel na elevação da pressão arterial. Além de seu efeito vasopressor a Ang II tem envolvimento na fisiologia reprodutiva. A Ang II está envolvida na regulação da secreção do hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH), ovulação, e comportamento sexual em ratos machos e fêmeas.

Nosso objetivo nesse trabalho foi analisar a regularidade do ciclo estral após a implantação do clipe, o comportamento sexual, peso ovariano, ovulação, como também, verificar as concentrações plasmáticas de estradiol, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) durante a tarde do proestro em ratas submetidas ao modelo 2R/1C.

Dos animais clipados, em torno de 55% apresentaram pressão arterial sistólica (PAS) maior que 150 mmHg, dessa forma os animais neste estudo foram divididos em três grupos: grupo de ratas FICT (submetidas à cirurgia fictícia), grupo 2R/1C (fêmeas submetidas à laparotomia, com dissecação da artéria renal esquerda, para a implantação de um clipe de prata de 0,15mm de diâmetro, e que apresentavam PAS <125 mmHg), e 2R/1C-H (fêmeas submetidas ao modelo 2R/1C e que apresentavam PAS >150 mmHg). No experimento I foi realizada análise do ciclo estral que iniciou-se no dia seguinte após a cirurgia, na noite do segundo proestro após o registro da PAS, o comportamento sexual foi registrado, e na manhã seguinte (estro), o número de óvulos foi contado. No

experimento II ratas FICT, 2R/1C, e 2R/1C-H, no segundo ou terceiro proestro, após registro dos parâmetros cardiovasculares, tiveram a veia jugular externa canulada às 11:00h da manhã. Amostras de 600 $\mu$ L de sangue foram coletadas às 13:00, 14:00, 15:00, 16:00, 17:00, 18:00, 19:00, e 20:00h. O sangue foi centrifugado, o plasma coletado foi destinado ao radioimunoensaio para estradiol, LH, e FSH. Ao final das coletas as ratas retornaram ao biotério, e na manhã seguinte (fase estro), tiveram os ovários coletados, pesados separadamente, e em seguida foi realizada a contagem do número de óvulos.

Os resultados mostraram que ratas 2R/1C-H e 2R/1C apresentam um maior tempo, em dias, para o retorno às mudanças de fases do ciclo estral, após a cirurgia. Ratas 2R/1C-H apresentaram redução na frequência de lordose e um menor quociente de lordose (Frequência de lordose/Frequência de monta). Foi verificada redução no número de óvulos nos animais 2R/1C-H e 2R/1C quando comparado ao grupo FICT. As concentrações plasmáticas de estradiol e FSH na tarde do proestro não foram diferentes entre os grupos, porém a concentração plasmática de LH no grupo hipertenso foi menor às 16:00h em relação ao demais grupos. A redução no número de óvulos em ratas 2R/1C-H e 2R/1C, na fase estro, foi confirmada no experimento II, porém esta não foi acompanhada por alteração no peso do ovário direito e esquerdo. Em conjunto nossos resultados demonstraram que ratas 2R/1C-H apresentam redução na capacidade reprodutiva, que não foi associada a alterações nas concentrações plasmáticas de estradiol e FSH, mas sim a uma modificação do perfil da curva de secreção de LH na tarde do proestro. Sugere-se que a redução na função reprodutiva verificada seja devido ao aumento de Ang II e/ou elevação da pressão arterial.

## **INTRODUÇÃO**

---

## **1. HIPERTENSÃO**

A hipertensão é a elevação sustentada da pressão arterial sistêmica (sistólica e/ou diastólica), é considerada uma síndrome heterogênea na qual vários fatores contribuem para o seu aparecimento (CARRETERO & OPARIL, 2000; GIORGI, 2005). Pode ser ou não acompanhada por lesão em órgãos como: rins, vasos sanguíneos, retina, coração (GIORGI, 2005).

A hipertensão é um dos fatores que contribuem para o desenvolvimento de doença cardiovascular e acidente vascular cerebral (GIORGI, 2005). Além disso, estudos epidemiológicos sugerem uma associação entre a doença hipertensiva e a patogênese de disfunções sexuais, onde os homens apresentam prejuízo da função erétil e ejaculação (MOREIRA et al., 2001; FERRARIO & LEVY, 2002; SASAYAMA et al., 2003), e as mulheres apresentam diminuição do orgasmo, libido, redução na lubrificação vaginal, ou infertilidade (DUNCAN & BATEMAN, 1993), associadas à hipertensão e ao tratamento anti-hipertensivo (LEWIS et al., 1998; DUNCAN et al., 2000; FOGARI et al., 2004).

Devido aos vários problemas decorrentes da hipertensão, como já citado acima, foram desenvolvidos modelos experimentais em animais para o seu estudo. Estes em sua maior parte envolvem a manipulação dos rins, do sistema nervoso ou das supra-renais, além da inibição de substâncias que participam e que integram o processo vasoativo da doença hipertensiva (RUZICKA & LEENEN, 1994; PINTO, PAUL, GANTEN, 1998). O estudo com animais possibilita a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos que

provocam esta ruptura na homeostase, contribuindo para o controle clínico, bem como melhora na qualidade de vida dos pacientes com esta doença.

## **2. Angiotensina**

A angiotensina II (Ang II) é o produto final da clivagem do angiotensinogênio que se inicia a partir da ativação da enzima renina (FITZSIMONS, 1980; BOTTARI et al., 1993; MORGAN; PIPKIN; KALSHEKER, 1996; SAAVEDRA, 2005). Vários trabalhos focalizam as ações da Ang II sobre a regulação da pressão arterial, balanço hídrico e controle da função reprodutiva (STEELE; NEGRO-VILAR; McCANN, 1981; STEELE; McCANN; NEGRO-VILAR, 1982; STEELE & GANONG, 1986; SAAVEDRA, 1992; GANONG, 1995; SANVITTO et al., 1997; PHILLIPS & SUMMER, 1998).

Nas últimas décadas foi demonstrada a existência de sistemas renina-angiotensina (SRA) locais presentes em diversos tecidos como: na parede arterial, pulmão, rins, adrenal, hipófise e gônadas (SAAVEDRA, 1992). No entanto, uma das descobertas mais importantes foi a descrição de um SRA cerebral (SAAVEDRA, 2005), atuando, inicialmente sobre o aumento da pressão sanguínea (BICKERTON & BUCKLEY, 1961).

A descoberta de receptores para a Ang II localizados em neurônios dentro da barreira hematoencefálica confirmaram a existência da produção de Ang II endógena, respondendo a Ang II gerada no cérebro, ou transportada através da barreira hematoencefálica. A presença de receptores para Ang II nos órgãos circunventriculares (OCVs) e em células endoteliais cerebrovasculares permitem que a Ang II periférica

tenha ações sobre o sistema nervoso central (SNC). Assim, o cérebro responde tanto a Ang II central e periférica, e os dois sistemas estão integrados (SAAVEDRA, 2005).

Os receptores de Ang II foram classificados, farmacologicamente, em dois subtipos: AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> (SAAVEDRA et al., 1993; TIMMERMANS et al., 1995; GASPARO et al., 2000). O receptor AT<sub>1</sub> é subdividido em duas isoformas distintas, AT<sub>1A</sub> e AT<sub>1B</sub>, é o predominante em cérebros de ratos adultos (TSUTSUMI & SAAVEDRA, 1991) e está localizado no plexo coróide, nas estruturas que correspondem aos OCVs e nas envolvidas na regulação cardiovascular e homeostase dos líquidos, na formação hipocampal, em áreas do sistema límbico relacionadas com o controle da função hipofisária, e na hipófise (JÖHREN & SAAVEDRA, 1996). Entretanto, o receptor AT<sub>2</sub> é mais encontrado no SNC de humanos, predominando em tecidos fetais (McGREGOR et al., 1995; TIMMERMANS et al., 1995), mostrando-se concentrado em áreas relacionadas ao controle e ao aprendizado da atividade motora, visual, sensorial e estruturas límbicas (TSUTSUMI & SAAVEDRA, 1991; SONG et al., 1992; TIMMERMANS et al., 1995).

## **2.1 Angiotensina II e pressão arterial**

A Ang II é reconhecida como um fator importante na patogênese da hipertensão clínica e experimental (DeFORREST et al., 1982; MARTINEZ-MALDONADO, 1991; NISHIMURA et al., 1992; KAGIYAMA et al., 2001). Perifericamente, a Ang II modula a pressão arterial através de uma potente ação vasoconstritora e por ativação dos receptores pré-sinápticos excitatórios nas terminações nervosas simpáticas pós-

ganglionares (FITZSIMONS, 1998; FERNANDEZ et al., 2003). Centralmente, a Ang II pode regular a pressão arterial por meio da liberação do peptídeo arginina-vasopressina, inibição sináptica baroreflexa para o núcleo trato solitário (NTS), e, ainda, por aumento da atividade do sistema nervoso simpático (LENKEI et al., 1997; ZHU et al., 2002).

O envolvimento da Ang II nas respostas cardiovasculares tem sido amplamente estudado. As rotas aferentes que levam a informação do sistema cardiovascular ao SNC iniciam nos receptores periféricos como os barorreceptores (receptores de pressão) localizados nas paredes do seio carotídeo e arco aórtico, e atriais (receptores de estiramento) na parede dos átrios direito e esquerdo. A despolarização das fibras sensoriais destas regiões codifica informações relacionadas com a pressão do sangue contra a parede das artérias (receptores do seio carotídeo e arco aórtico) e com o volume sanguíneo total ou retorno venoso (receptores atriais) (SPYER, 1994; BUCCAFUSCO, 1996).

Pesquisas que relacionam a ação da Ang II com a manutenção da hipertensão em ratos adultos têm demonstrado que microinjeções de Ang II dentro do NTS produz aumento dose-dependente da pressão arterial sistêmica, o mesmo ocorrendo quando as injeções de Ang II são via intracerebroventricular (icv) (PLUNKETT & SAAVEDRA, 1985). Pesquisas realizadas em camundongos mutantes, com ausência do gene que codifica o receptor AT<sub>2</sub>, demonstraram um significativo aumento da pressão em resposta à administração intravenosa de Ang II (ICHIKI et al., 1995). Dados mais específicos mostraram o envolvimento do receptor AT<sub>1A</sub> na fase aguda da hipertensão renovascular, onde a administração intravenosa de um *antisense* para o receptor AT<sub>1A</sub> promoveu uma

diminuição do número total do respectivo receptor em tecidos periféricos de ratos machos 2R/1C (GALLI & PHILLIPS, 2001).

## **2.2 Modelo de Hipertensão Renovascular**

O modelo de hipertensão renovascular descrito por Goldblatt e colaboradores (1934) é caracterizado por apresentar um esquema fisiopatológico no qual há estágios temporais no desenvolvimento e manutenção da hipertensão renovascular, sendo sua regulação determinada pelo envolvimento de uma inter-relação neural e hormonal (MARTINEZ-MALDONADO, 1991).

Neste modelo experimental a elevação da pressão arterial é mediada pela ativação do SRA, a qual ocorre após ser realizada a restrição do suprimento de sangue para um dos rins, por clampeamento da artéria renal, sendo que o rim contralateral é mantido intacto: modelo 2 Rins/ 1 Clipe (2R/1C), ou o rim contralateral é retirado: modelo 1 Rim/ 1 Clipe (1R/1C) (MARTINEZ-MALDONADO, 1991; RUZICKA & LEENEN, 1994; NAVAR et al., 1998).

A constrição de uma das artérias renais, e a preservação do rim contralateral resultam numa elevação progressiva da pressão arterial, cujos níveis pressóricos são dependentes do grau de constrição da artéria renal imposta pelo diâmetro do clipe e da extensão desta constrição (RUZICKA & LEENEN, 1994). O clampeamento da artéria renal esquerda produz pequena elevação da pressão arterial já no primeiro dia após estenose (SCHRIKER et al., 1994), e em seguida ocorre gradual elevação na pressão que é independente do grau de estenose imposto pelo clipe, porém os valores de pressão arterial

atingidos variam conforme este grau, podendo resultar em hipertensão de moderada a severa (RUZICKA & LEENEN, 1994).

A elevação da pressão arterial sistêmica devido ao aumento da concentração de Ang II circulante é promovida por meio de ações rápidas (agudas) e a longo prazo (crônicas). A curto prazo ocorre o aumento da resistência periférica total mediada pela Ang II circulante. A longo prazo o que se verifica é o aumento no volume sanguíneo mediado por ações renais da Ang II e aldosterona, efeitos tróficos da Ang II nos músculos cardíaco e liso dos vasos, e aumento da atividade simpática, que parecem participar na manutenção da hipertensão nas fases crônicas (MARTINEZ-MALDONADO, 1991; RUZICKA & LEENEN, 1994; KAGIYAMA et al., 2001).

Estudos que investigam a fisiopatologia molecular do modelo 2R/1C demonstram que quatro semanas depois de aplicado o clipe na artéria renal a concentração de Ang II cerebral apresenta-se elevada (MORISHITA et al., 1993). Em seis semanas é verificado que a responsividade do sistema adrenérgico central em áreas relacionadas com o controle cardiovascular encontra-se aumentada (JUNG; LEE; KIM, 2004).

Este modelo se demonstra próprio para o estudo de disfunções sexuais que ocorrem em situações de hipertensão, principalmente por estar esta hipertensão associada a um aumento das concentrações de Ang II, tanto periférica quanto central.

### **3. FISILOGIA REPRODUTIVA**

A reprodução compreende todos os eventos fisiológicos, somáticos e comportamentais, que asseguram a perpetuação da espécie. Em mamíferos a reprodução

encontra-se sob o controle dos sistemas nervoso e endócrino que atuam de forma coordenada na promoção, desenvolvimento e na maturação dos caracteres sexuais e dos comportamentos relacionados a cada sexo (LIBERTUN, 2004).

A função reprodutiva fica prejudicada quando alterações no eixo hipotálamo-hipófise, ou na própria gônada, comprometem tanto a parte comportamental quanto a gametogênica. Vários fatores podem promover alterações na função reprodutiva, dentre estes encontramos a hipertensão (CLARK, 1995).

### **3.1 O Ciclo Estral da Rata**

Grande parte do conhecimento que possuímos sobre o controle do ciclo ovariano de vários mamíferos, é baseado em estudos sobre o ciclo estral de ratas (FREEMAN, 1994). O ciclo ovariano da rata apresenta fase folicular curta, e é composto basicamente de quatro fases: o estro, metaestro, diestro, e o proestro, estas fases podem ser verificadas por meio das mudanças na mucosa vaginal, a qual apresenta padrão distinto de distribuição de células epiteliais, leucócitos e células queratinizadas em cada fase do ciclo (MATTHEWS & KENYON, 1984; FREEMAN, 1994).

Na fase de estro, que possui duração de 25 a 27 horas, a mucosa vaginal apresenta células queratinizadas. A seguinte fase: metaestro, com duração de 6 à 8 horas, pode ser identificada pela presença de células epiteliais, leucócitos e células queratinizadas. Essa fase precede o diestro, que tem duração de 55 a 57 horas e apresenta mucosa com predomínio de leucócitos e presença de muco, podendo aparecer algumas células

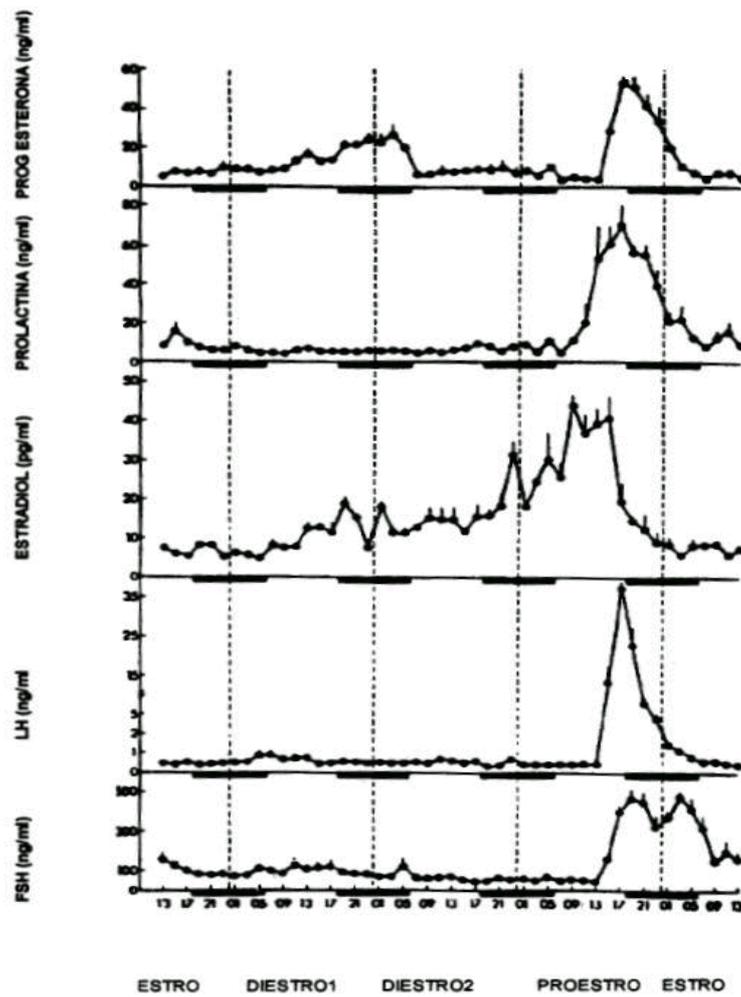
epiteliais. Após, ocorre o proestro com duração de 12 a 14 horas, fase que a mucosa vaginal caracteriza-se por células epiteliais (FREEMAN, 1994).

Em cada fase do ciclo estral verifica-se variações nas concentrações hormonais de esteróides gonadais, de gonadotrofinas (Figura 01) (BUTCHER; COLLINS; FUGO et al., 1974; SMITH; FREEMAN; NEILL, 1975; FREEMANN, 1994), e observam-se alterações comportamentais.

A concentração plasmática de estradiol varia durante as fases do ciclo, apresentando-se baixa no estro e começando a elevar-se na tarde do metaestro, até atingir concentrações mais altas no meio dia do proestro, sendo fundamental para o pico pré-ovulatório de gonadotrofinas, após diminui sua concentração, atingindo níveis basais no início da madrugada do estro (SMITH; FREEMAN; NEILL, 1975; FREEMAN, 1994). O aumento de estrógeno no diestro induz a um aumento na secreção de gonadotrofinas na tarde do proestro (FREEMAN, 1994). O mecanismo pelo qual o estrógeno estimula a secreção de LHRH (hormônio liberador do hormônio luteinizante) ainda não está claro. Dados indicam que o sistema noradrenérgico central pode ser o principal mediador do mecanismo de retroalimentação positivo dos esteróides gonadais, pois lesão eletrolítica no *locus coeruleus* na manhã do proestro, em ratas ciclando regularmente, diminui o conteúdo de noradrenalina na área pré-óptica medial (APOM) e hipotálamo médio basal bloqueando a onda pré-ovulatória de gonadotrofinas, e com isso ovulação (ANSELMO-FRANCI et al., 1997), não tendo o estrógeno ação direta sobre os neurônios LHRH (SHIVERS et al., 1983; JENNES et al., 1992; HERBINSON et al., 1995).

O padrão de secreção de prolactina (PRL), LH e FSH apresenta-se baixo até à tarde da fase proestro, onde fazem pico. O pico plasmático para o LH, importante para o processo ovulatório, ocorre entre as 15:00 e 18:00h da fase proestro. Para o FSH, o que se verifica é uma elevação na secreção a partir das 15:00h do proestro, com a presença de um pico na madrugada desta fase. A concentração plasmática de PRL sobe na fase proestro, com pico às 15:00h retornado aos níveis basais por volta das 06:00h do estro (SMITH; FREEMAN; NEILL, 1975). A PRL é o maior hormônio luteotrófico que inicia e mantém a secreção de progesterona pelo corpo lúteo (SMITH; FREEMAN; NEILL, 1975), e é importante para o comportamento de receptividade ao macho, na rata (MANI, 2003). O FSH liga-se a seus receptores nas células da granulosa dos folículos primários e estimula a produção de estradiol a partir dos andrógenos, além disso, tem o papel de recrutar novos folículos que possam depois responderem a FSH e LH e crescer para o próximo ciclo (SCHWARTZ, 2000).

O padrão de secreção de progesterona durante o ciclo consiste de dois picos, sendo verificado concentrações elevadas entre a tarde do metaestro e manhã do diestro, onde os valores começam a cair permanecendo baixos até à tarde do proestro onde faz pico (SMITH; FREEMAN; NEILL, 1975). A rápida elevação de progesterona facilita o comportamento reprodutivo na fêmea e liberação de LH para o processo ovulatório (PFAFF; VASUDEVAN; ATTARDI, 2000), além disso, progesterona é essencial para a reprodução porque induz no endométrio a transcrição de genes específicos envolvidos com a implantação do blastocisto (CHABBERT-BUFFET et al., 2000).



**Figura 01:** Variações hormonais nas diferentes fases do ciclo estral da rata (SMITH; FREEMAN; NEILL, 1975).

### **3.2 Comportamento Sexual da rata**

Como já mencionado, uma inter-relação entre mecanismos neurais e endócrinos é necessária para a ocorrência dos eventos fisiológicos e comportamentais reprodutivos (FREEMAN, 1994). A coordenação dos eventos fisiológicos com comportamento é um pré-requisito para sucesso na reprodução (SIMERLY, 2002). A ação dos hormônios gonadais promove a diferenciação do sistema nervoso revelando condutas distintas entre machos e fêmeas no que se refere ao comportamento sexual e a atitudes relacionadas à reprodução (PILGRIM & REISERT, 1992; SIMERLY, 2002).

O conceito de “diferenciação sexual do sistema nervoso” pode ser constituído pela fase “organizacional” e “ativacional” dos hormônios sexuais: a primeira é o período crítico, logo após o nascimento, durante o qual circuitos neurais específicos de cada sexo são consolidados, e a segunda é quando, no adulto, os hormônios sexuais são requeridos para ativar aqueles circuitos e propiciar o desencadeamento dos aspectos fisiológicos da função reprodutiva (KELLY, 1991; PILGRIM & REISERT, 1992; McCORMICK et al., 1998). Assim, os hormônios sexuais exercem alterações estruturais e neuroquímicas em áreas e circuitos sexualmente dimórficos (NAFTOLIN, 1981).

O estrógeno é importante na coordenação e regulação de vários aspectos da reprodução (SHUGHRUE et al., 1992). Neurônios sensíveis ao estrógeno foram encontrados predominantemente na APOM, no hipotálamo tuberal, em regiões límbicas como amígdala e parte do mesencéfalo e córtex cerebral (KATO & VILLEE, 1967). SHUGHRUE et al. (1992) verificaram que a concentração do RNA mensageiro (RNAm) para o receptor de estrógeno altera-se durante o ciclo estral, e existe expressão

diferencial no sistema nervoso, estes aspectos verificados podem ser os determinantes da instalação do comportamento reprodutivo e o período da ovulação.

O período em que a rata está pronta para o coito denomina-se estro comportamental, nesta fase o comportamento proeminente verificado é a postura para a cópula, ou seja, a curvatura espinhal, assumida pela fêmea que é denominada lordose. Quando a rata em proestro é estimulada sobre ou perto dos flancos, arqueia o dorso e fica completamente imóvel, para auxiliar a inserção peniana do macho (BEHBEHANI, 1995). Na ausência da lordose a intromissão e ejaculação não são possíveis. Há receptores sensoriais nos flancos e no períneo da fêmea que, quando estimulados, suas aferências sensoriais ascendem pela coluna anterolateral da medula espinhal. As fibras ascendentes atingem a formação reticular e o núcleo vestibular lateral. Terminações sensoriais ascendentes no tronco cerebral não controlam imediatamente os neurônios descendentes de uma maneira simples. A facilitação da resposta eferente descendente do tronco cerebral para o comportamento de lordose possui uma natureza tônica, o que reflete em parte as influências estrogênicas no hipotálamo. A circuitaria que facilita o comportamento de lordose é formada por células nervosas próximas e no núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH). Do VMH as eferências seguem através de uma trajetória periventricular medial ou lateral para a formação reticular e substância cinzenta periaqueductal (PAG). Neurônios na substância central enviam axônios descendentes para a formação reticular do bulbo. O sinal eferente descendente ativa neurônios reticuloespinhais e eles atuam em conjunto com neurônios vestibuloespinhais lateral que controlam os músculos dorsais que executam o comportamento de lordose (PFAFF; VASUDEVAN; ATTARDI, 2000).

Os efeitos facilitatórios sobre o comportamento sexual na rata ocorrem por ação da progesterona e pela ação de seu receptor, e isto está relacionado com a distribuição dinâmica de seus receptores no hipotálamo (MANI; BLAUSTEIN; O'MALLEY, 1997; AUGER, 2001; MANI, 2001), por exemplo a ovariectomia abole a lordose, que é praticamente restaurada pelo tratamento com estradiol, no entanto o tratamento adicional com progesterona amplifica drasticamente o efeito estimulatório do estradiol sobre o comportamento sexual da rata (FLANAGAN-CATO, 2000; LEVINE et al., 2001).

Está bem estabelecido a existência de uma via dependente de estrógeno e progesterona, a qual exerce um efeito estimulatório para o reflexo de lordose e inclui o sistema olfatório acessório (ASO), núcleo medial da amígdala (MeA) e VMH (ROWE & ERSKINE, 1993; DUDLEY; RAJENDREN; MOSS, 1996; FLANAGAN-CATO; CALIZO; DANIELS, 2001). O ASO é composto pelo órgão vomeronasal (região quimicamente sensível aos feromônios localizada dentro da cavidade nasal), pelo bulbo olfatório acessório e projeções do bulbo olfatório acessório, as quais são enviadas para o núcleo MeA (KRETTEK & PRICE, 1978). Durante a execução do comportamento sexual estas regiões apresentam aumento no número de células imunorreativas para Fos, indicando aumento da atividade neuronal (RAJENDREN & MOSS, 1993). Por outro lado, a remoção de qualquer um dos componentes desta via não permite que ocorra o reflexo de lordose, induzido pelo macho, mesmo em presença de concentrações adequadas de estrógeno e progesterona (RAJENDREN; DUDLEY; MOSS, 1990; RAJENDREN & MOSS, 1993).

Evidências têm demonstrado aumento da atividade de neurônios produtores de LHRH, predominantemente no septo medial, órgão vascularizado da lâmina terminal,

APOM e área hipotalâmica anterior, durante a ativação de regiões envolvidas no comportamento sexual. Além disso, a atividade desses neurônios se mostra diminuída nos casos de destruição de áreas envolvidas no reflexo de lordose, sugerindo a participação deste hormônio neste comportamento (RAJENDREN & MOSS, 1993).

### **3.3 Angiotensina e Função Reprodutiva**

Tem sido demonstrado que a Ang II afeta a secreção dos hormônios da hipófise anterior (GANONG, 1993). Por meio de uma série de trabalhos STEELE et al. (1982; 1983; 1985; 1986 e 1992) verificaram que Ang II está envolvida na regulação da secreção de LHRH e ovulação. A Ang II age de forma a aumentar a secreção de LHRH na fase proestro, o que contribui para o pico de LH registrado na tarde desta fase, e, portanto ovulação.

Corroborando com os resultados obtidos por STEELE et al., trabalhos de PHILLIPS et al. (1993) verificaram que há mudanças nas concentrações hipotalâmicas de Ang II e secreção de Ang II em ratas ovariectomizadas e repostas com estradiol e progesterona, sendo evidenciado um pico na concentração hipotalâmica de Ang II uma hora antes do pico de LH plasmático. Em ratas na fase proestro verifica-se padrão semelhante, as concentrações de Ang II no líquido cefalorraquidiano alcançam valores de pico entre 12:30 e 13:30h retornando a valores semelhantes a de fêmeas em diestro após este horário (GHAZI et al., 1994).

Os efeitos facilitatórios da Ang II sobre a secreção de LHRH podem ocorrer por meio da ação direta ou indireta na APOM ou por combinação de ambas as ações. A ação

indireta da Ang II sobre a APOM ocorre pela facilitação da liberação de noradrenalina (STEELE & GANONG, 1986; STEELE, 1992) para a APOM. Esta ação ocorreria via *locus coeruleus*: a Ang II promove a secreção de noradrenalina do *locus coeruleus* que por sua vez atua sobre receptores alfa-adrenérgicos da APOM. O *locus coeruleus* tem participação na secreção de LHRH, pois lesão eletrolítica deste núcleo bloqueia o pico plasmático de LH na tarde do proestro (ANSELMO-FRANCI et al., 1997; MARTINS-AFFÉRI et al., 2003). Diretamente a Ang II estimula a secreção de LHRH (STEELE, 1987; STEELE, 1992) da APOM via receptor AT<sub>1</sub> (DORNELLES & FRANCI, 1998). Portanto, os estudos evidenciam que a Ang II eleva-se no cérebro mais ou menos uma hora antes das concentrações de LH no plasma fazerem pico, e direta e indiretamente a Ang II estimula a secreção de LHRH, o que eleva o LH plasmático na fase proestro, e também favorece ovulação.

Além do SRA central, a existência de um SRA ovariano está bem estabelecida, e este tem demonstrado importância no desenvolvimento folicular, esteroidogênese, maturação do ovócito, e ovulação, assim considera-se o SRA ovariano como um sistema autócrino, parácrino e endócrino (BUMPUS et al., 1988; YOSHIMURA, 1997; SPETH; DAUBERT; GROVE, 1999).

Estudos evidenciaram que além de seu importante efeito dipsinogênico, a Ang II central também modula outros comportamentos, como por exemplo o comportamento sexual em ratos machos e fêmeas. Microinjeções icv de Ang II diminuem o comportamento sexual em ratos machos (CLARK, 1989) e estudos complementares verificaram que este efeito modulador seria mediado pelo receptor AT<sub>1</sub> (KEATON & CLARK, 1998). A administração de microinjeções de Ang II no MeA aumenta a

latência para o comportamento ejaculatório em ratos machos (BREIGEIRON et al., 2002), e inibe o comportamento de lordose em ratas (CECCONELLO, 2005). Assim, conforme as evidências experimentais citadas que mencionam a importância da Ang II na fisiologia reprodutiva, a investigação das alterações das concentrações de Ang II in vivo como as que ocorrem no modelo de hipertensão renovascular constituem uma importante linha de pesquisa para verificação das implicações Ang II elevada in vivo na fisiologia reprodutiva.

**JUSTIFICATIVA**

---

O ovário da rata possui todos os componentes do SRA.

A Ang II central tem importância na facilitação da elevação da concentração plasmática de LH na fase proestro.

Considerando-se que no modelo de hipertensão renovascular ocorre um aumento da Ang II central, além do aumento da Ang II plasmática, acreditamos que situações de Ang II elevada, como as produzidas no modelo de hipertensão renovascular, poderiam ser prejudiciais a esteroidogênese, comportamento sexual e ovulação.

O modelo de hipertensão renovascular, portanto, compõe uma importante ferramenta para o esclarecimento das associações/interações entre Ang II elevada em um modelo *in vivo*, hipertensão arterial. E como a maioria dos estudos com animais experimentais são realizados em machos devido à complexidade inerente às variações hormonais em fêmeas, as possíveis alterações reprodutivas em fêmeas, por aumento da Ang II merecem ser avaliadas.

**OBJETIVO**

---

---

Este trabalho teve por objetivo verificar aspectos da função reprodutiva em ratas submetidas ao clampeamento da artéria renal esquerda, modelo: 2 Rins/1 Clipe (2R/1C).

## **EXPERIMENTO I**

### **1. Objetivos específicos**

Verificar a regularidade do ciclo estral, o comportamento sexual, e a ovulação em ratas submetidas ao modelo 2R/1C.

## **Experimento II**

### **2. Objetivos específicos**

Verificar as concentrações plasmáticas de estradiol, LH e FSH durante a tarde do proestro, bem como o peso ovariano e ovulação em ratas submetidas ao modelo 2R/1C.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

## **1. ANIMAIS**

Foram utilizados ratos machos e fêmeas adultos, da variedade *Wistar* provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os animais foram mantidos sob condições de temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e luz (6:00 as 18:00) controlados, e tiveram livre acesso à água e ração padrão.

## **2. GRUPOS EXPERIMENTAIS**

Neste trabalho 110 ratas que apresentavam ciclo estral regular foram utilizadas para o experimento. Os grupos experimentais que compuseram este trabalho foram:

- Cirurgia fictícia (**FICT**): ratas que foram submetidas a laparotomia com dissecação da artéria renal esquerda, porém sem a colocação do clipe de prata.
- 2 Rins / 1 Clipe (**2R/1C**): ratas que foram submetidas à cirurgia de clampeamento da artéria renal (modelo de hipertensão renovascular) com colocação de um clipe de prata de 0,15mm de diâmetro na artéria renal esquerda, e que apresentavam PAS <125 mmHg.

- 2 Rins / 1 Clipe hipertensas (**2R/1C-H**): ratas que foram submetidas à cirurgia de clampeamento da artéria renal (modelo de hipertensão renovascular) com colocação de um clipe de prata de 0,15mm de diâmetro na artéria renal esquerda, e que apresentavam valores de PAS >150 mmHg.

### **3. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS**

#### **3.1 Hipertensão Renovascular - modelo de Goldblatt tipo I: 2 Rins/1 Clipe (2R/1C)**

Ratas que apresentavam no mínimo três ciclos regulares consecutivos, estando na fase de diestro, foram submetidas à cirurgia de clampeamento da artéria renal esquerda, modelo experimental de hipertensão renovascular tipo I descrito por GOLDBLATT et al. (1934).

Os animais foram anestesiados com o relaxante muscular xilazina (Ronpum 100mg/mL - Profarb, MG) e o anestésico cloridrato de ketamina (Ketalar 50mg/mL - Parke-Davis, SP) na dose de 100 mg/kg peso corporal, via intraperitoneal.

Em seguida os animais foram posicionados em decúbito dorsal, para a realização de uma incisão mediana na região abdominal com tamanho aproximado de 3cm logo abaixo do apêndice xifóide. Esta abertura foi realizada por planos até a cavidade peritoneal. Com o auxílio de cotonetes (embebidos em solução fisiológica aquecida) ocorreu o afastamento de vísceras abdominais. O rim esquerdo foi isolado em campo cirúrgico por tiras de algodão, também embebidas em soro fisiológico aquecido. Com o hilo renal esquerdo identificado foi iniciado o isolamento da artéria renal esquerda que teve seu diâmetro diminuído com a colocação de um clipe de prata de tamanho 2 x 8mm,

dobrado em "V" e abertura interna de 0,15mm. Os animais permaneceram com este clipe renal até apresentarem o segundo ou terceiro proestro após o registro dos parâmetros cardiovasculares verificados por pletismografia caudal.

No grupo FICT (controle), foi realizada a mesma cirurgia, no entanto não houve a colocação do clipe.

#### **4. REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA**

##### **4.1 Pletismografia Caudal**

O registro da PAS e frequência cardíaca (FC) foi realizado pelo método não invasivo da pletismografia caudal, utilizando o sistema da KENT SCIENTIFIC (RTBP 1001 Rat Tail Blood Pressure System for rats and mice, Litchfield, USA). Para a realização do registro dos parâmetros cardiovasculares os animais foram colocados durante 1 hora na sala, para a adaptação ao novo ambiente. Passado este intervalo, a PAS e a FC foram determinadas.

O registro da PAS e FC foi feito na fase clara do ciclo claro-escuro, no décimo dia após a intervenção cirúrgica. Durante o mesmo, os animais foram colocados em um tubo de acrílico, no qual, em uma das extremidades se tinha acesso à cauda do animal. O tubo de acrílico foi coberto por um pano o que permitiu uma menor exposição do animal ao ambiente. Foram realizados no mínimo dois pré-testes para adaptação do animal, ou seja, somente a partir do terceiro dia do registro foi considerado os valores de PAS e FC.

À cauda do animal era colocado um transdutor pneumático acoplado a um esfingomanômetro, e na presença de sinal adequado eram realizadas consecutivamente

determinações da PAS durante 4 minutos e 30 segundos. A PAS obtida consistiu da média de 5 a 8 registros obtidos neste período.

Nesta etapa do experimento é que o grupo 2R/1C, conforme PAS foi subdividido em 2R/1C-H (PAS >150 mmHg) e 2R/1C (PAS <125 mmHg).

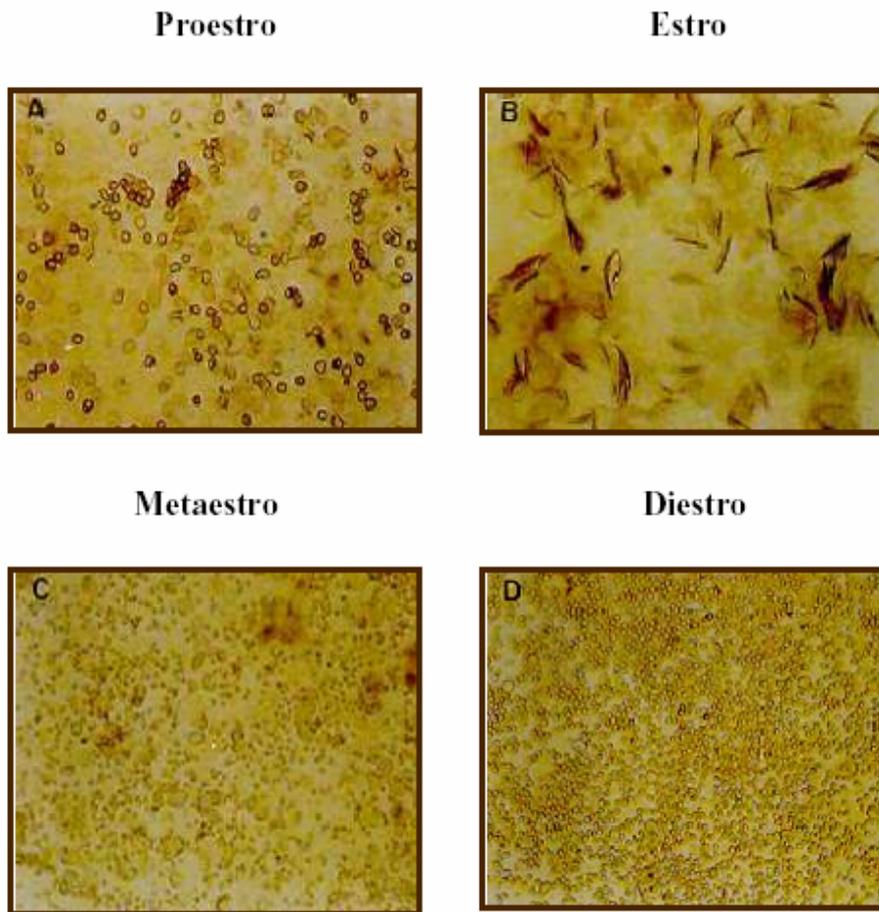
## **EXPERIMENTO I**

### **1. ANÁLISE DO CICLO ESTRAL**

No dia seguinte à cirurgia iniciou-se diariamente a coleta do esfregaço vaginal às 9 horas da manhã (Figura 02), segundo técnica de LONG & EVANS (1922). Após a coleta, o esfregaço era analisado a fresco em um microscópio (Figura 03). No final do período experimental, a análise do ciclo estral consistiu em verificar quanto tempo, em dias, ratas FICT, 2R/1C, e 2R/1C-H, demoravam a apresentar mudanças nas fases do ciclo estral após a intervenção cirúrgica, e qual o percentual de animais que retornavam a ciclar regularmente após 15 dias a contar da cirurgia.



**Figura 02:** Coleta do esfregaço vaginal para análise do ciclo estral.



**Figura 03:** Células coletadas por meio de esfregaço vaginal nas diferentes fases do ciclo estral da rata.

## **2. COMPORTAMENTO SEXUAL**

Este experimento teve como objetivo verificar o comportamento sexual pela medida do quociente de lordose (índice de lordose/monta) exibido pela fêmea em proestro quando colocada com um macho sexualmente ativo.

### **2.1 Seleção de ratos machos sexualmente ativos**

Ratos machos foram colocados em caixas de ambientação com 20 x 50cm, com fêmeas receptivas (uma fêmea para cada dois machos), e permaneceram assim durante quinze dias a fim de adquirirem experiência sexual (treino). Após este período, as fêmeas foram retiradas das caixas, e os ratos permaneceram sozinhos por mais sete dias (período de abstinência sexual). Passado este período de três semanas, estes ratos foram testados em seu desempenho sexual.

O teste de desempenho sexual consistiu em avaliar durante dez minutos o comportamento do macho perante uma fêmea receptiva. As fêmeas utilizadas tanto para o teste como para o treino foram submetidas a ovariectomia. Dez dias após a ovariectomia, foram induzidas à receptividade sexual por injeções subcutâneas de benzoato de estradiol (benzo-ginoestril ap 5mg - SARSA, RJ) na dose de 2 µg/rata, 48 horas antes do teste, e progesterona-Sigma na dose de 500µg/rata, mais benzoato de estradiol na dose de 2 µg/rata, 6 horas antes do teste (MAS et al., 1987). Os machos que, ao serem colocados com as fêmeas, apresentavam mais de seis intromissões penianas no período de dez minutos, foram considerados como sexualmente ativos e separados para

serem submetidos ao experimento de verificação do quociente de lordose exibido por ratas, na noite da fase proestro.

## **2.2 Seleção de fêmeas em Proestro e Registro Comportamental**

Fêmeas dos grupos FICT, 2R/1C, e 2R/1C-H, quando apresentaram o segundo ou terceiro proestro após o registro da PAS e FC, foram submetidas ao registro do comportamento sexual.

Para o registro do comportamento sexual, os ratos foram colocados em caixas de observação com dimensões de 70 x 70 x 35cm cujas paredes eram de aço com exceção da parede frontal que era de vidro, o que permitiu a ampla visualização dos animais. O chão das caixas de observação, assim como o das caixas de ambientação, foi coberto com maravalha.

Em todo o experimento, o registro foi realizado de uma a seis horas após início da fase escura. Inicialmente, o macho foi retirado da caixa onde estava ambientado para ser colocado na caixa de observação por um período de dez minutos para adaptação ao novo ambiente. Após este intervalo, a fêmea foi colocada com o macho na caixa de observação iniciando-se, imediatamente a seguir, a sessão de registro do comportamento sexual que teve duração de quinze minutos para os comportamentos de monta exibidos pelo macho, e de lordose pela fêmea. O registro consistiu em filmar os animais com uma filmadora de vídeo.

Ao término do registro, este foi visualizado com o auxílio de um aparelho de vídeo por um observador treinado que digitou, num microcomputador com programa

especialmente elaborado, uma tecla selecionada para cada comportamento à medida que este ocorria. O programa computou a frequência de cada comportamento. A frequência é o número de vezes que cada comportamento ocorre durante o registro. A duração foi caracterizada como o tempo total de ocorrência de um comportamento específico.

Os parâmetros comportamentais avaliados foram:

- **Locomoção:** movimentos de exploração do ambiente realizados pela fêmea como parâmetro de resposta a estímulos recebidos.
- **Frequência de lordose** (toda vez que a fêmea eleva a parte traseira do dorso para o macho montar), **e monta** (toda vez que o macho usa as patas dianteiras para agarrar a fêmea pelos flancos).
- **Quociente de lordose:** número de lordose divididos pelo número de montas.

### **3. CONTAGEM DO NÚMERO DE ÓVULOS**

Ratas FICT, 2R/1C e 2R/1C-H submetidas ao registro do comportamento sexual na noite do proestro, e que na manhã seguinte às 9:00h estavam na fase estro, foram primeiramente pesadas, em seguida decapitadas, e por meio de uma laparotomia tiveram os ovários removidos. Os ovidutos foram dissecados, lavados em solução salina 0,9%, e colocados entre duas lâminas, entre as quais foram comprimidos para posterior contagem do número de óvulos por meio de um microscópio óptico (Zeiss, Goettingen, Germany) com lentes de aumento de 2,5x (GOMES et al., 1999).

Além disso, o rim esquerdo e o rim direito também foram retirados e pesados, para posterior cálculo do índice renal. O índice renal foi obtido pela divisão do peso renal do rim (mg) sobre o peso corporal (g).

#### **4. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados foram comparados entre os três grupos (FICT, 2R/1C, 2R/1C-H) pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida de Newman-Keuls e expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).  $p < 0,05$  foi adotado como critério de significância.

### **EXPERIMENTO II**

Ratas FICT, 2R/1C, e 2R/1C-H no segundo ou terceiro proestro após registro dos parâmetros cardiovasculares, tiveram a veia jugular externa canulada às 11:00h da manhã. Amostras de 600 $\mu$ L de sangue foram coletadas em seringas heparinizadas de hora em hora, iniciando às 13:00h do mesmo dia (horário das coletas: 13:00, 14:00, 15:00, 16:00, 17:00, 18:00, 19:00, e 20:00 horas) perfazendo um total de 8 coletas. Após a remoção de cada amostra sangüínea um volume igual de NaCl 0,9% estéril foi repostado. O sangue coletado foi centrifugado por 30 minutos à 3.000 rpm e estocado (-80°C) para posterior dosagem de estradiol, LH, e FSH por radioimunoensaio.

## **1. CANULAÇÃO DA VEIA JUGULAR**

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de solução de tribromoetanol (Aldrich Chem. Comp. Inc.) 2,5% em salina. A dose utilizada foi de 1mL/100g de peso corporal (POLETINI et al., 2003).

Após a anestesia uma cânula de silicone foi introduzida na veia jugular externa, com o auxílio de uma agulha de implantação, a cânula foi suturada no músculo peitoral maior e a parte livre da cânula foi externalizada no pescoço, um pouco abaixo das orelhas, conforme técnica descrita por HARMS & OJEDA (1974). A cânula foi mantida cheia de solução fisiológica até o momento da coleta de sangue.

## **2. Dosagem Hormonal**

A concentração plasmática de estradiol foi determinada por radioimunoensaio utilizando-se *kits* MAIA<sup>®</sup> da BioChem. ImmunoSystems (Bologna, Itália). O limite mínimo para detecção para o estradiol foi de 7,5 pg/mL. Para as dosagens de LH e FSH foram utilizados *kits* específicos fornecidos pela National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive and Kidney Diseases (NIADDK, Baltimore – USA), e o anticorpo para precipitação foi produzido pelo laboratório do Prof. Dr. Celso R. Franci (FMRP – USP), o limite mínimo para a detecção do LH foi de 0,04ng/mL, e para o FSH 0,39ng/mL. Além disso, os erros intra-ensaios para o estradiol foi 3,2%, para o LH 4% e FSH 3,2%.

### **3. PESO DOS OVÁRIOS E CONTAGEM DO NÚMERO DE ÓVULOS**

Ratas FICT, 2R/1C e 2R/1C-H submetidas a coleta de sangue na tarde do proestro, e que na manhã seguinte às 9:00h estavam na fase estro, foram primeiramente pesadas, em seguida decapitadas, e por meio de uma laparotomia tiveram os ovários (direito e esquerdo) removidos, e pesados separadamente. Os ovidutos foram dissecados, lavados em solução salina 0,9%, e colocados entre duas lâminas, entre as quais foram comprimidos para posterior contagem do número de óvulos por meio de um microscópio óptico (Zeiss, Goettingen, Germany) com lentes de 2,5x (GOMES et al., 1999).

Além disso, o rim esquerdo e o rim direito também foram retirados e pesados, para posterior cálculo do índice renal. O índice renal foi obtido pela divisão do peso renal (mg) sobre o peso corporal (g). É importante ressaltar que os resultados referentes ao peso corporal, PAS, FC, peso renal direito e esquerdo, índice renal direito e esquerdo dos animais utilizados no experimento II foram analisados juntamente com os respectivos resultados do experimento I.

### **4. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados referentes à concentração plasmática de estradiol, LH e FSH dos três grupos experimentais foram comparados pela análise de variância (ANOVA) de duas vias (grupo e horário) e de medidas repetidas, seguida de Newman-Keuls. Foi realizado o cálculo da área abaixo da curva da concentração plasmática de estradiol, LH e FSH das 13:00 às 20:00 da tarde do proestro. Os resultados obtidos da área abaixo da curva

da concentração plasmática de estradiol, LH e FSH, bem como do peso do ovário direito e esquerdo e número total de óvulos foram analisados por meio de ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls. Os resultados foram expressos pela média  $\pm$  EPM, e  $p < 0,05$  foi adotado como critério de significância.

## **RESULTADOS**

---

---

## **1. CIRURGIA E CLAMPEAMENTO RENAL**

O sucesso de desenvolvimento de hipertensão, observado neste estudo, ao utilizar o modelo de hipertensão renovascular descrito por GOLDBLATT et al. (1934), foi de 55%.

### **1.1 Peso Corporal**

O peso corporal, verificado ao final do experimento, foi semelhante [ $F(2,69)=2,06$ ,  $p=0,135$ ] entre os grupos estudados (Figura: 04).

### **1.2 Pressão Arterial Sistólica e Frequência Cardíaca**

A PAS foi maior [ $F(2,69)=197,0$ ,  $p<0,0001$ ] no grupo de ratas 2R/1C-H quando comparado aos grupos 2R/1C e FICT, e ratas 2R/1C apresentaram PAS maior que ratas FICT (Figura: 05A). A FC foi maior [ $F(2,69)=20,28$ ,  $p<0,0001$ ] em ratas 2R/1C-H quando comparado aos demais grupos (Figura: 05B).

### **1.3 Peso Renal**

Ratas 2R/1C-H e 2R/1C apresentaram um aumento [ $F(2,69)=21,93$ ,  $p<0,0001$ ] no peso renal direito (Figura: 06A) e uma redução [ $F(2,69)=73,83$ ,  $p<0,0001$ ] no peso renal esquerdo (Figura: 06B) quando comparado ao grupo FICT. Foi verificado também, que o peso renal esquerdo foi menor no grupo 2R/1C-H em relação ao grupo 2R/1C.

#### **1.4 Índice Renal**

O grupo de ratas 2R/1C-H e 2R/1C tiveram aumento [ $F(2,69)=31,43, p<0,0001$ ] no índice renal direito (Figura: 07A), e uma redução [ $F(2,69)=61,27, p<0,0001$ ] no índice renal esquerdo (Figura: 07B) quando comparado ao grupo FICT. O índice renal esquerdo foi menor no grupo 2R/1C-H em relação ao grupo 2R/1C.

### **EXPERIMENTO I**

#### **1. CICLO ESTRAL**

O tempo médio em dias para retornar a mudanças nas fases do ciclo estral foi maior [ $F(2,69)=20,29, p<0,0001$ ] em ratas 2R/1C-H e 2R/1C quando comparado ao grupo FICT, e ratas hipertensas quando comparadas às 2R/1C apresentaram um tempo maior para voltar a mudanças nas fases do ciclo estral (Figura: 08A). Além disso, foi verificado que depois de 15 dias, após realizado os procedimentos cirúrgicos, o percentual de animais que retornaram ao ciclo regular foi menor no grupo de ratas 2R/1C-H, contudo, todos os animais FICT retornaram a ciclar regularmente (Figura: 08B).

## **2. COMPORTAMENTO SEXUAL**

### **2.1 Freqüência de Lordoses**

Ratas 2R/1C-H apresentaram uma diminuição [ $F(2,37)=4,85$ ,  $p<0,02$ ], quando comparadas ao grupo FICT, na média de freqüência de lordoses em 15 minutos, quando testadas na noite do proestro com machos sexualmente ativos (Figura: 09A).

### **2.2 Freqüência de Montas**

Machos sexualmente ativos colocados com fêmeas 2R/1C e FICT, na noite do proestro não apresentaram diferença na média da freqüência de montas [ $F(2,37)=0,46$ ,  $p=0,63$ ], em 15 minutos sobre as fêmeas 2R/1C quando comparados ao grupo FICT (Figura: 09B).

### **2.3 Quociente de lordose (número de lordose/número de montas)**

O quociente de lordose apresentado por ratas 2R/1C-H na noite do proestro, quando testadas com ratos machos sexualmente ativos, apresentou uma diminuição [ $F(2,37)=6,35$   $p<0,005$ ] quando comparado ao grupo de ratas FICT, contudo não foi diferente do grupo 2R/1C (Figura: 10).

### **2.4 Freqüência e Duração da Locomoção**

Ratas 2R/1C-H e 2R/1C, quando comparadas ao grupo FICT, durante o registro do comportamento sexual, não apresentaram alteração quanto ao tempo de exploração do

ambiente, ou seja, frequência de locomoção [F(2,37)=0,90, p=0,42] (Figura: 11A) e duração total de locomoção [F(2,37)=0,26, p=0,77] na arena (Figuras: 11B).

### **3. CONTAGEM DO NÚMERO DE ÓVULOS**

Ratas 2R/1C-H e 2R/1C, na fase estro, mostraram uma redução [F(2,37)=13,53, p<0,0001] do número de óvulos em relação ao grupo FICT, como pode ser verificado na Figura: 12.

## **EXPERIMENTO II**

### **1. PERFIL HORMONAL**

#### **1.1 Estradiol**

A Figura: 13 apresenta a concentração plasmática de estradiol (pg/mL) na tarde do proestro (avaliada das 13:00 às 20:00h), em ratas FICT, 2R/1C, e 2R/1C-H. A ANOVA de duas vias de medidas repetidas demonstrou efeito grupo [F(2,30)=3,39, p<0,05] e horário [F(7,210)=19,95, p<0,0001], porém não ocorreu interação grupo-horário [F(14,210)=1,09, p=0,37]. O *post hoc* demonstrou que às 17:00, 18:00, 19:00 e 20:00h as concentrações plasmáticas de estradiol foram diferentes em relação aos demais horários estudados, independentemente do grupo, o que caracteriza uma curva normal para o estradiol na tarde do proestro, e que o grupo de ratas 2R/1C apresenta maior

secreção de estradiol quando comparado ao grupo FICT. A área abaixo da curva do estradiol foi semelhante entre os grupos [ $F(2,30)=3,00$ ,  $p=0,07$ ] (Figura: 14).

## **1.2 LH**

A concentração plasmática de LH (ng/mL) das 13:00 às 20:00h da tarde do proestro em ratas FICT, 2R/1C, 2R/1C-H, pode ser observada na Figura: 15. A ANOVA de duas vias de medidas repetidas demonstrou efeito para horário [ $F(7,210)=41,04$ ,  $p<0,0001$ ], porém não ocorreu efeito grupo [ $F(2,30)=1,36$ ,  $p=0,27$ ]. Houve interação entre grupos e horários estudados [ $F(14,210)=20,30$ ,  $p<0,0001$ ]. O *post hoc* revelou que a concentração plasmática de LH no grupo hipertenso foi menor às 16:00h em relação ao demais grupos. E que das 16:00 até às 19:00h a secreção de LH foi maior nos grupos FICT e 2R/1C quando comparado aos primeiros horários estudados. Já para o grupo 2R/1C-H a concentração plasmática de LH foi maior das 16:00 até às 20:00 quando comparado às 13:00, 14:00, e 15:00h. Na Figura: 16 pode ser visualizada a área abaixo da curva para o LH, a qual apresentou-se semelhante entre os grupos [ $F(2,30)=2,04$ ,  $p=0,15$ ].

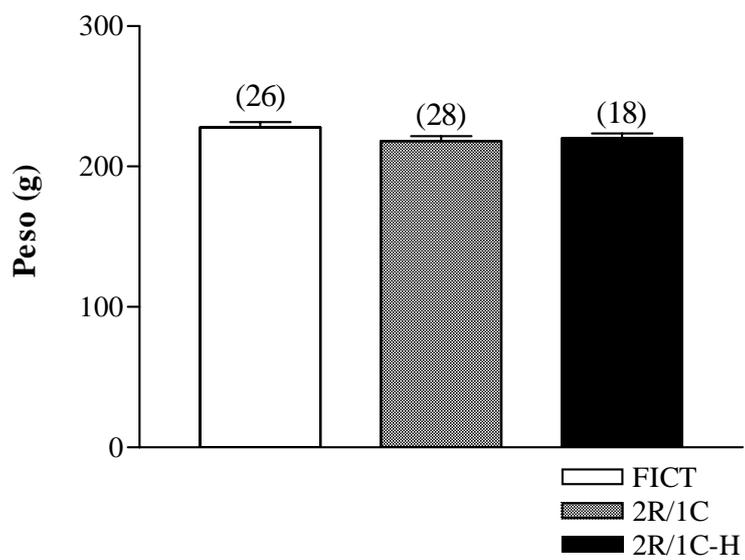
## **1.3 FSH**

A Figura: 17 apresenta a concentração plasmática de FSH (ng/mL) na tarde do proestro, em ratas FICT, 2R/1C, e 2R/1C-H. A ANOVA mostrou que não ocorreu efeito grupo [ $F(2,30)=2,91$ ,  $p=0,07$ ], e interação [ $F(14,210)=1,44$ ,  $p=0,14$ ]. Porém, ocorreu efeito horário [ $F(7,210)=33,30$ ,  $p<0,0001$ ], o teste de Newman-Keuls demonstrou que o FSH plasmático na tarde do proestro apresenta maior concentração das 16:00 até às

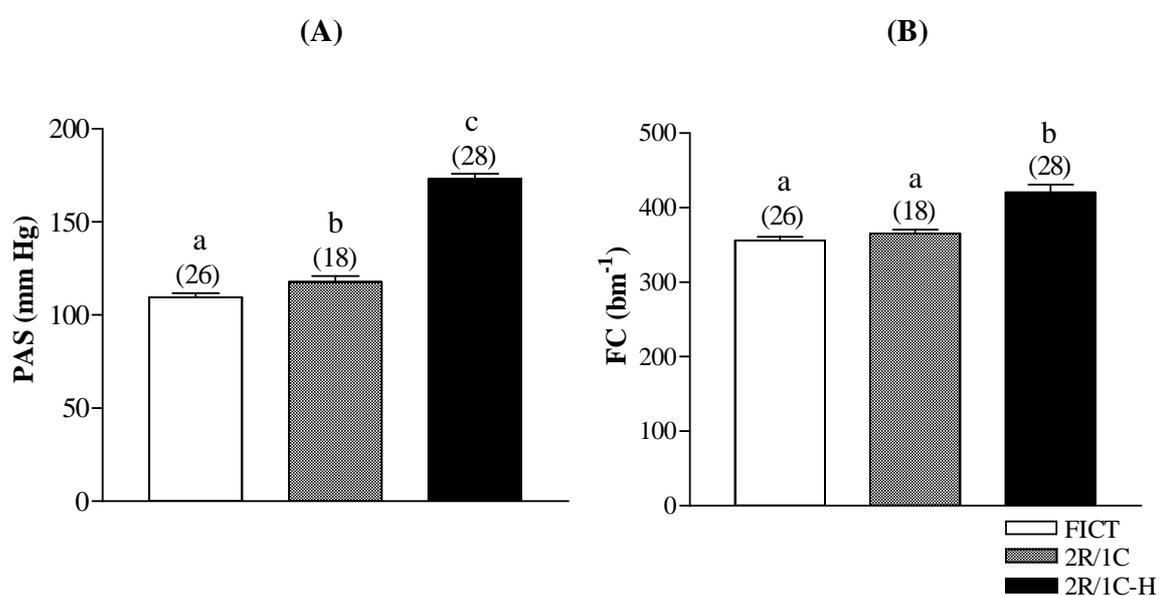
20:00 em relação aos primeiros horários estudados, o que caracteriza uma curva normal de secreção de FSH na tarde do proestro, independente do grupo estudado. A área abaixo da curva do FSH foi semelhante para os grupos estudados [ $F(2,30)=1,00$ ,  $p=0,38$ ] (Figura: 18).

## **2. PESO DOS OVÁRIOS E CONTAGEM DO NÚMERO DE ÓVULOS**

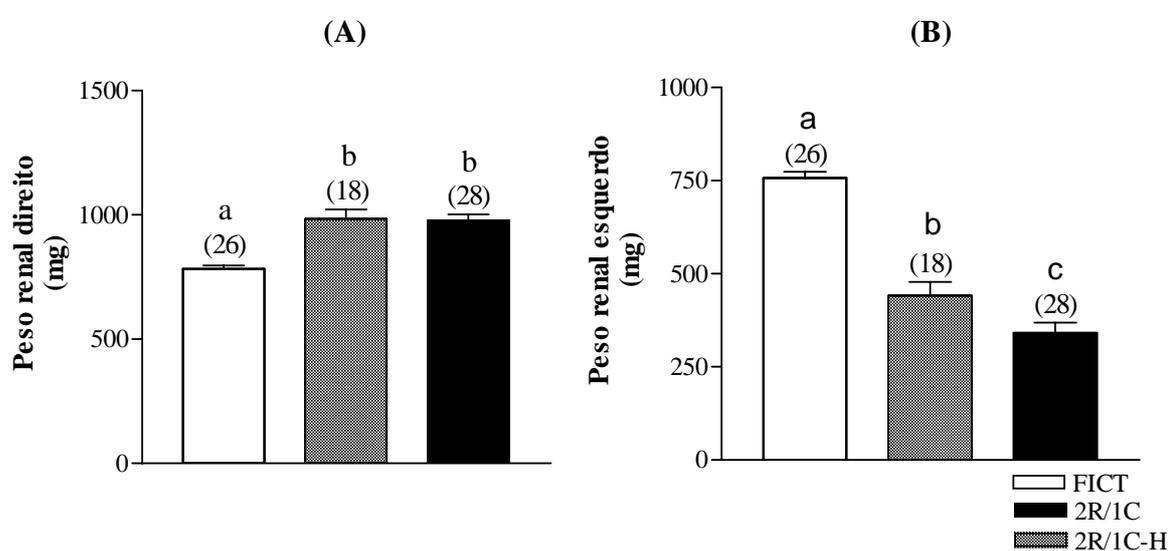
Ratas 2R/1C-H e 2R/1C, na fase estro, mostraram uma redução [ $F(2,29)=7,41$ ,  $p<0,003$ ] do número de óvulos em relação ao grupo FICT (Figura: 20), a redução do número de óvulos não foi acompanhada por alteração no peso do ovário direito [ $F(2,29)=0,25$ ,  $p=0,78$ ] (Figura: 19A), e esquerdo [ $F(2,29)=1,10$ ,  $p=0,35$ ] (Figura: 19B).



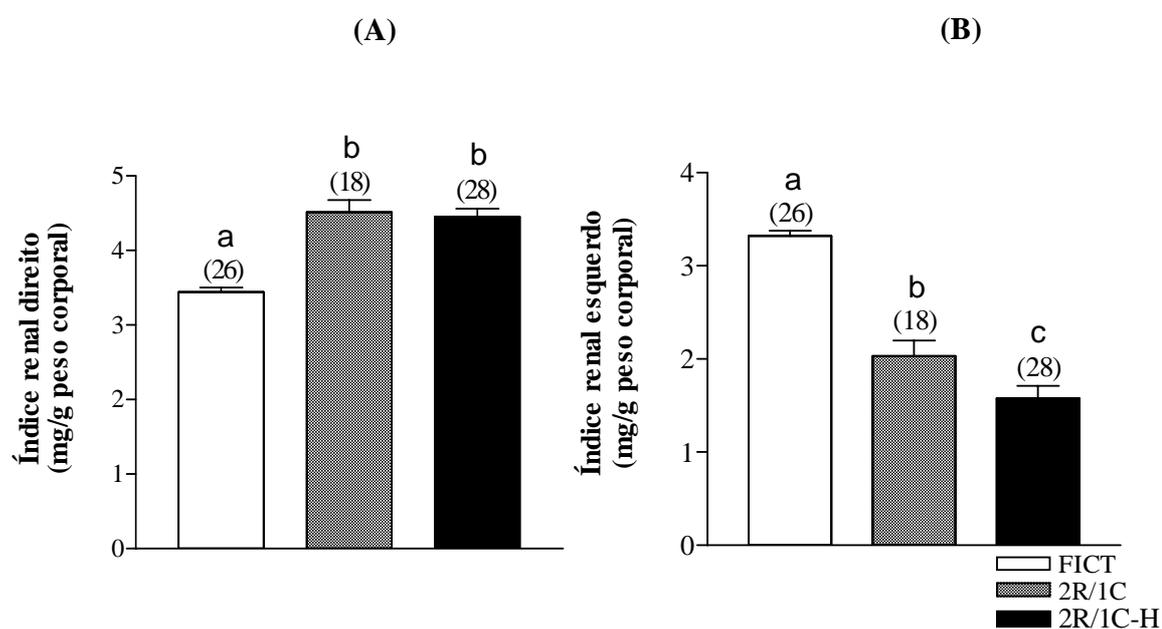
**Figura 04:** Peso corporal de ratas FICT, 2R/1C, 2R/1C-H. As barras indicam a média±EPM.  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).



**Figura 05:** (A) Pressão Arterial Sistólica (mmHg); e (B) Frequência Cardíaca (bm<sup>-1</sup>), de ratas FICT, 2R/1C, 2R/1C-H. As barras indicam a média±EPM. Letras diferentes indicam diferenças significativas, p<0,05 (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).

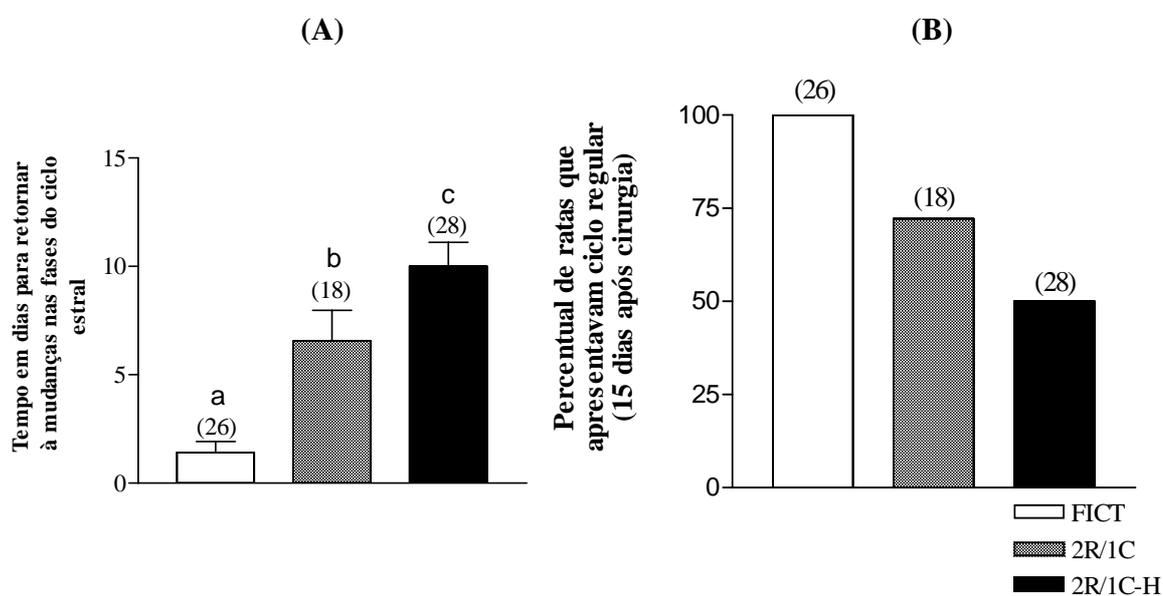


**Figura 06:** (A) Peso renal direito; e (B) Peso renal esquerdo, de ratas FICT, 2R/1C, 2R/1C-H. As barras indicam a média±EPM. Letras diferentes indicam diferenças significativas,  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).

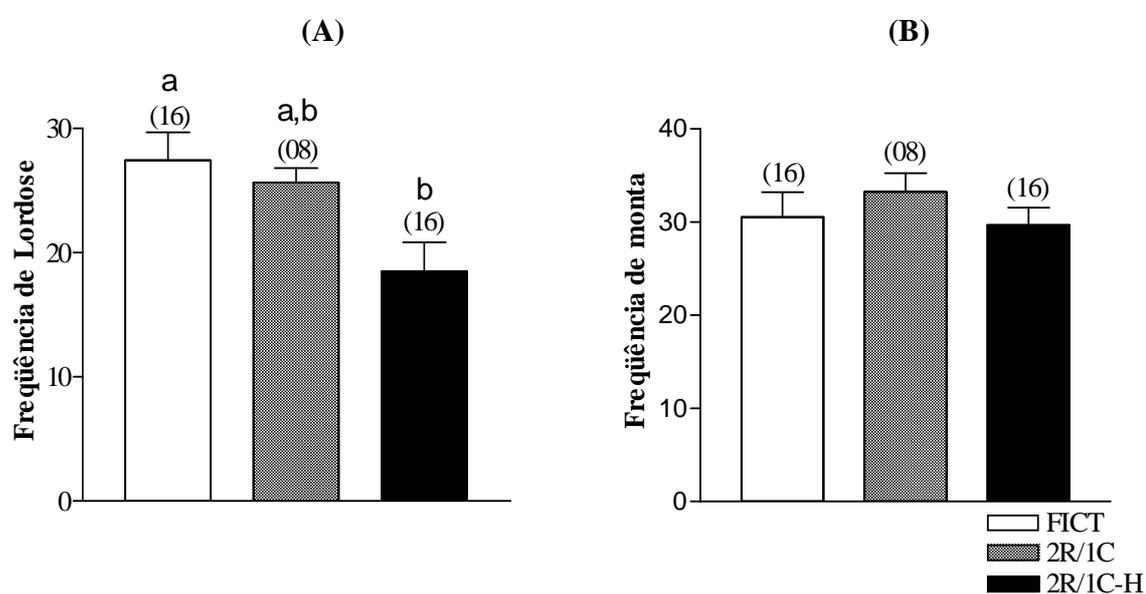


**Figura 07:** (A) Índice renal direito; e (B) Índice renal esquerdo, de ratas FICT, 2R/1C, 2R/1C-H. As barras indicam a média±EPM. Letras diferentes indicam diferenças significativas,  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).

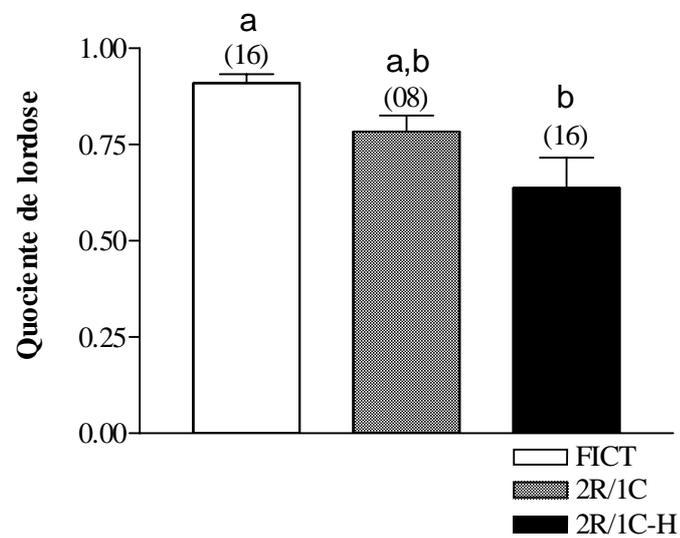
## EXPERIMENTO I



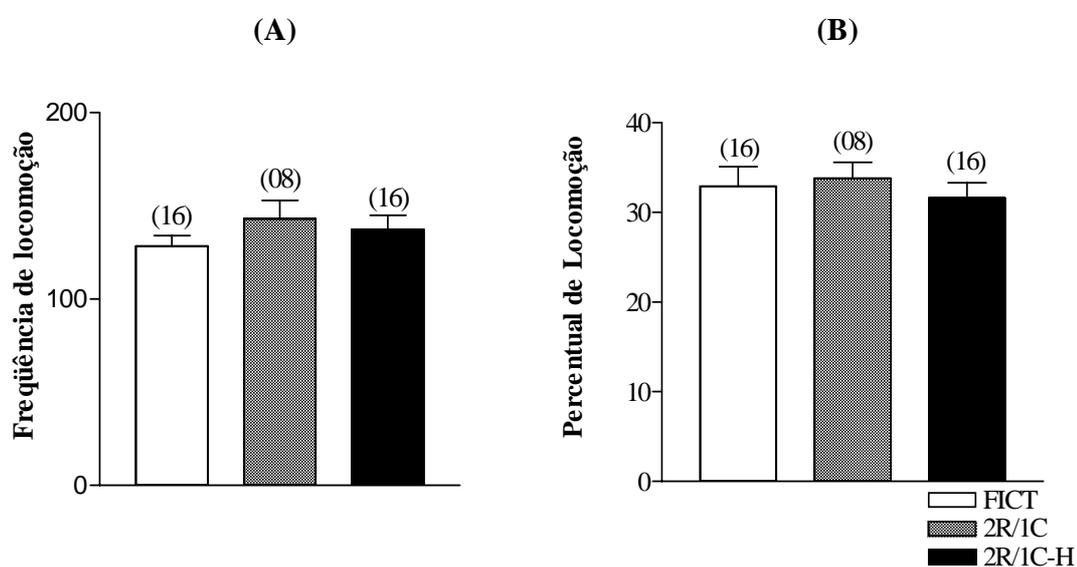
**Figura 08:** (A) Tempo em dias (média±EPM) para o retorno a mudanças consecutivas nas fases do ciclo estrol, após cirurgia, em ratas FICT, 2R/1C, 2R/1C-H; e (B) Percentual de ratas FICT, 2R/1C, 2R/1C-H que retornaram ao ciclo estrol regular após 15 dias da intervenção cirúrgica. Letras diferentes se referem à diferenças significativas,  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).



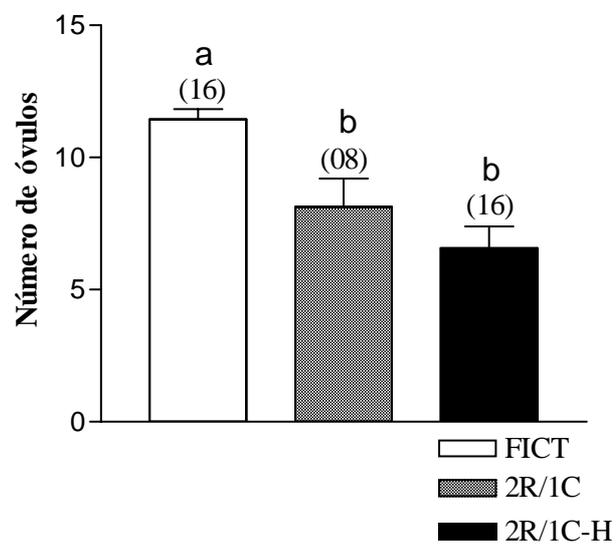
**Figura 09:** (A) Número de lordoses em 15 minutos (média±EPM), apresentado por ratas FICT, 2R/1C e 2R/1C-H, em proestro, quando testadas com machos sexualmente ativos. (B) Número de montas do macho em 15 minutos (média±EPM) quando testados com fêmeas FICT, 2R/1C e 2R/1C-H, em proestro. As barras indicam a média±EPM. Letras diferentes indicam diferenças significativas,  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).



**Figura 10:** Quociente de lordose (média±EPM) de ratas FICT, 2R/1C, 2R/1C-H, em proestro, quando testadas com machos sexualmente ativos. Letras diferentes indicam diferenças significativas,  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).

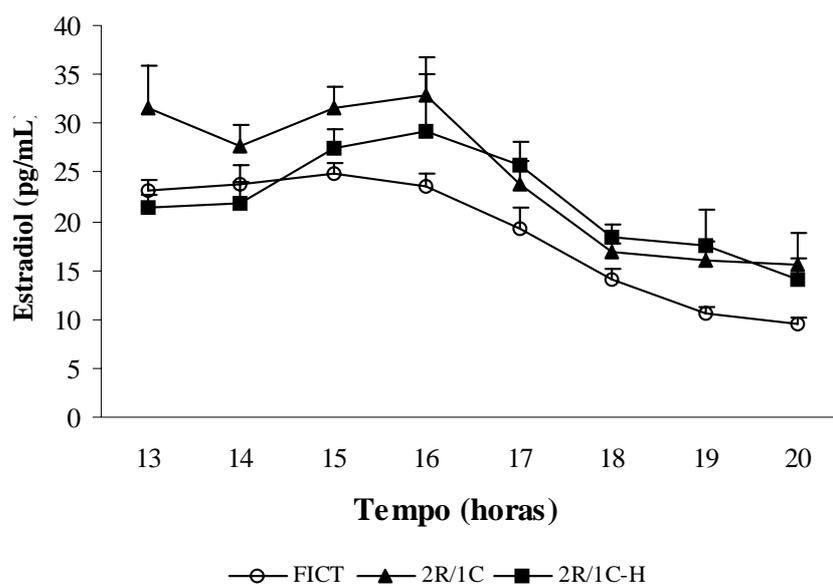


**Figura 11:** (A) Média  $\pm$  EPM da frequência de locomoção; e (B) Média  $\pm$  EPM do percentual da duração de locomoção durante 15 minutos, apresentado por ratas FICT, 2R/1C, 2R/1C-H, em proestro, durante o registro do comportamento sexual (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).

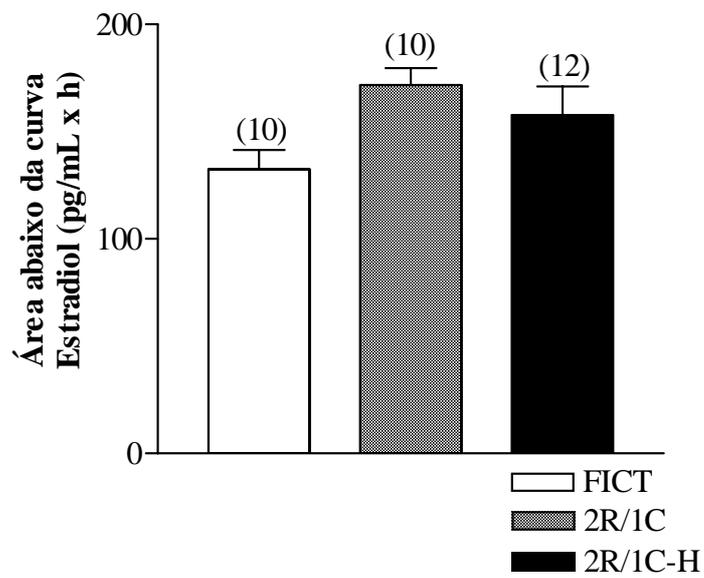


**Figura 12:** Número de óvulos (média±EPM) de ratas FICT, 2R/1C, 2R/1C-H, na fase estro. Letras diferentes se referem a diferenças significativas,  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).

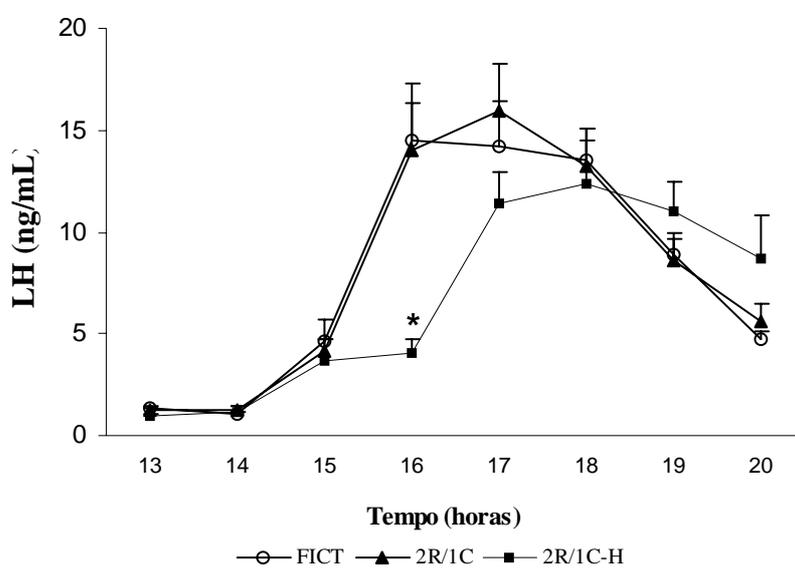
## EXPERIMENTO II



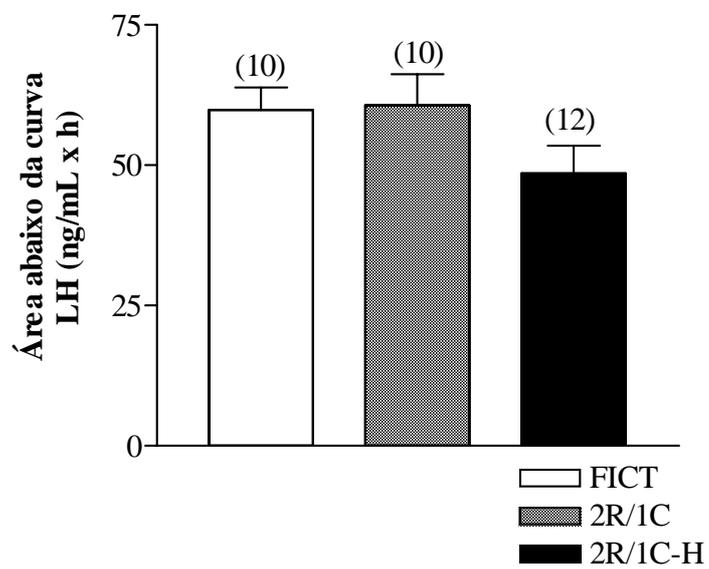
**Figura 13:** Concentração plasmática de estradiol (pg/mL) na tarde do proestro (das 13:00 às 20:00h) em ratas FICT, 2R/1C, e 2R/1C-H.  $p < 0,05$  (ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguida de Newman-Keuls).



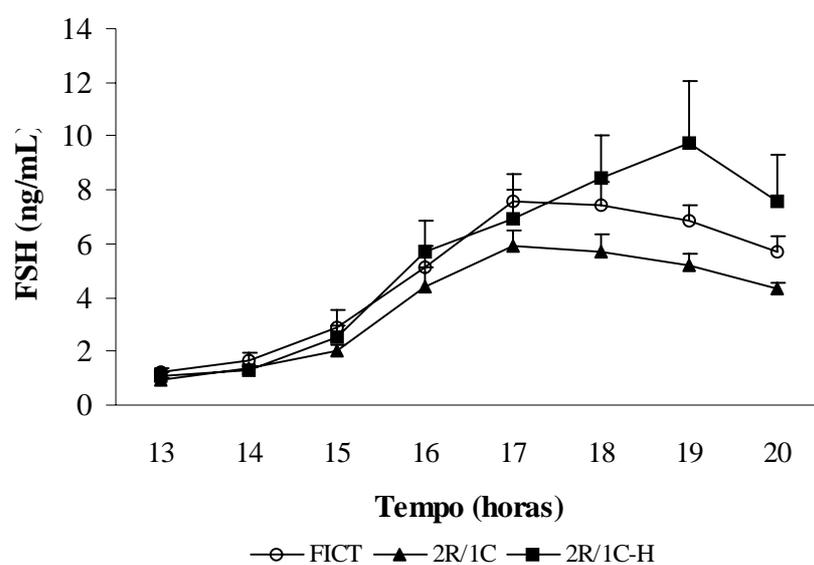
**Figura 14:** Média  $\pm$  EPM da área abaixo da curva das concentrações plasmáticas de estradiol durante a tarde do proestro (das 13:00 às 20:00h) de ratas FICT, 2R/1C, 2R/1C-H.  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).



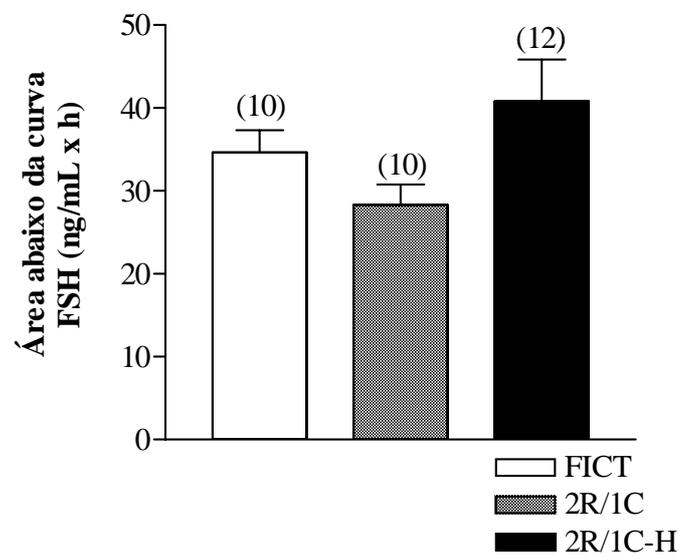
**Figura 15:** (A) Concentração plasmática de LH (ng/mL) na tarde do proestro (das 13:00 às 20:00h) em ratas FICT, 2R/1C, e 2R/1C-H. \* indica diferenças significativas,  $p < 0,05$  (ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguida de Newman-Keuls).



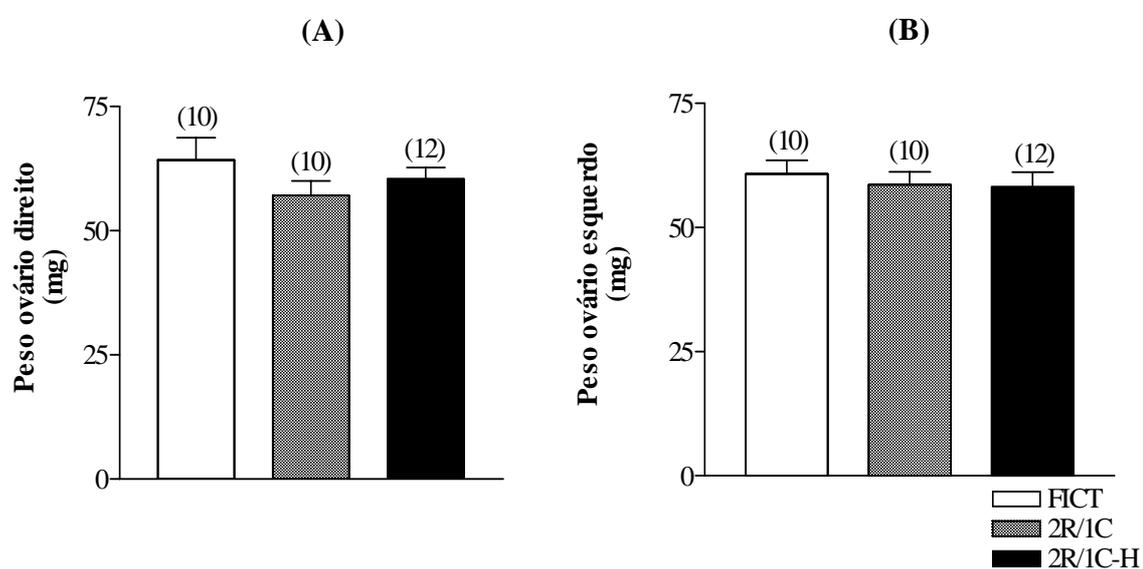
**Figura 16:** Média  $\pm$  EPM da área abaixo da curva das concentrações plasmáticas de LH durante a tarde do proestro (das 13:00 às 20:00h) de ratas FICT, 2R/1C, 2R/1C-H.  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).



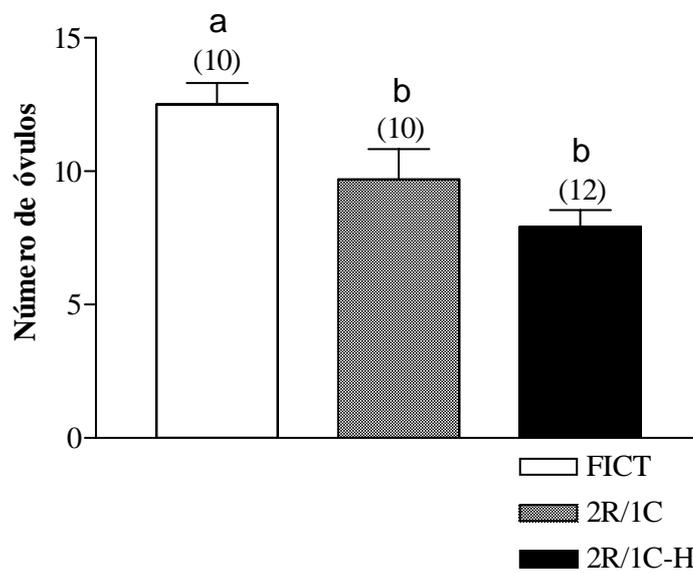
**Figura 17:** (A) Concentração plasmática de FSH (ng/mL) na tarde do proestro (das 13:00 às 20:00h) em ratas FICT, 2R/1C, e 2R/1C-H.  $p < 0,05$  (ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguida de Newman-Keuls).



**Figura 18:** Média  $\pm$  EPM da área abaixo da curva das concentrações plasmáticas de FSH durante a tarde do proestro (13:00 às 20:00h) de ratas FICT, 2R/1C, 2R/1C-H.  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).



**Figura 19:** (A) Peso do ovário direito; e (B) Peso do ovário esquerdo (média±EPM), de ratas FICT, 2R/1C, 2R/1C-H, na fase estro.  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).



**Figura 20:** Número de óvulos (média±EPM) de ratas FICT, 2R/1C, 2R/1C-H, na fase estro. Letras diferentes se referem a diferenças significativas,  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls).

**DISCUSSÃO**

---

O presente estudo teve por objetivo verificar a função reprodutiva em ratas submetidas ao clampeamento da artéria renal esquerda modelo 2R/1C. Nossos resultados mostraram que o clampeamento da artéria renal e a elevação da pressão arterial em fêmeas é acompanhada por redução na receptividade sexual, menor número de óvulos, alterações na regularidade das mudanças de fases do ciclo estral e menor percentual de animais que retornam ao ciclo estral regular após a cirurgia. As alterações sobre a função reprodutiva na rata hipertensa, não são acompanhadas por modificações na secreção de estradiol, bem como de FSH na tarde do proestro. É necessário ressaltar que na ovulação ratas 2R/1C-H e 2R/1C apresentaram prejuízos semelhantes, conforme pode ser verificado no experimento I (Figura: 12) e confirmado no experimento II (Figura: 20).

Para melhor abordagem dos parâmetros avaliados em nosso estudo dividimos a discussão em tópicos.

### **1. Hipertensão renovascular**

A aplicação do clipe na artéria renal esquerda, em nosso estudo, levou à hipertensão, em parte dos animais, como comprovado por meio do aumento da PAS, FC, redução do peso e índice renal esquerdo e aumento do peso e índice renal direito.

A redução no índice renal esquerdo indica hipotrofia devido à redução do fluxo sanguíneo para o rim esquerdo, em contraposição o aumento no índice renal direito indica hipertrofia deste rim devido à compensação nos processos de filtração renal (OKUNIEWSKI et al., 1998).

Neste estudo, foi observado que cerca de 55% dos animais selecionados para o experimento apresentaram hipertensão, resultado que está de acordo com a literatura (OKUNIEWSKI et al., 1998). Pelo fato de que 45% das ratas clipadas não desenvolveram hipertensão, resolvemos avaliar a função reprodutiva nestes animais também, já que há poucos estudos em ratas que foram submetidas ao modelo 2R/1C, e foi demonstrado que o sucesso de desenvolvimento de hipertensão renovascular, em fêmeas, é muito menor do que em machos (OKUNIEWSKI et al., 1998).

Apesar de obtermos um menor percentual de animais que desenvolveram hipertensão, quando comparado a machos submetidos ao modelo 2R/1C (OKUNIEWSKI et al., 1998), as ratas 2R/1C-H e 2R/1C apresentaram resposta renal semelhante, como demonstrado pelo menor índice renal esquerdo (Figura: 07B), que não foi decorrente da relação peso renal/ peso corporal, pois ambos grupos apresentaram peso corporal semelhante entre si, e quando comparado ao grupo FICT (Figura: 04). Sabe-se que a Ang II no rim produz vasoconstrição nas arteríolas aferente e eferente, reduzindo a pressão capilar glomerular, e desta forma, diminuindo filtração glomerular e fluxo sanguíneo renal, e que em paralelo pode ocorrer a estimulação da secreção de contrarreguladores, como óxido nítrico e prostaglandinas (ARIMA, 2003). Portanto, no caso das ratas 2R/1C a secreção de contrarreguladores pode ter sido mais acentuada que nas ratas 2R/1C-H, impedindo que a elevação de Ang II expressasse ações renais como

por exemplo, maior reabsorção de sódio e retenção de líquido (NAVAR et al., 1998) e assim, contribuição para o aumento da pressão arterial sistêmica. É claro que a hipótese de que uma completa oclusão da artéria renal possa ser o determinante do insucesso do desenvolvimento da hipertensão nestes animais, também não pode ser descartado. Porém, em nossos resultados, o peso renal esquerdo e índice renal esquerdo em ratas 2R/1C (Figuras: 06B e 07B) foram maiores em relação às 2R/1C-H, o que sugere também, que nesses animais, a completa oclusão da artéria renal esquerda não tenha ocorrido. Além disso, é importante ressaltar com base no resultado do maior peso renal esquerdo dos animais 2R/1C em relação aos 2R/1C-H, que a redução no fluxo sanguíneo para o rim esquerdo possa não ter sido a necessária ou suficiente por todo o experimento, para que ocorresse secreção de renina, e conseqüente aumento da Ang II circulante, e desta forma determinando o insucesso de desenvolvimento da hipertensão nestes animais.

## **2. Ciclo Estral**

Ratas clampeadas apresentaram um tempo maior em dias para retornar as mudanças nas fases do ciclo estral, sendo que o grupo 2R/1C-H apresentou um tempo maior para retomar as mudanças nas fases do ciclo quando comparado ao grupo 2R/1C, e também um maior percentual de ratas que não retornaram a ciclar regular após a cirurgia (Figuras: 08A e 08B).

Os estudos da função reprodutiva em ratas hipertensas são escassos. OKUNIEWSKI et al. (1998), em seus experimentos, verificaram que o esfregaço

vaginal de ratas submetidas ao modelo 2R/1C não se apresentava uniforme, e portanto sugeriram que estes animais ciclavam regularmente. Mas, em nosso trabalho demonstramos que, após a cirurgia, ratas clipadas apresentam um retardo para retornar a mudanças nas fases do ciclo estral, e um menor percentual de ratas 2R/1C-H que retornam a ciclar regularmente após a cirurgia (Figura: 08). Como ratas do grupo FICT retornaram em poucos dias às mudanças nas fases do ciclo e ao ciclo regular, sugerimos desta forma que distúrbios não relacionados ao estresse da cirurgia afetam o ciclo estral em ratas clipadas. Possivelmente, a elevação gradual de Ang II e instalação da hipertensão em ratas clipadas poderiam estar afetando a regularidade do ciclo nestes animais.

O envolvimento do SNC em regular a secreção da hipófise anterior, estimulando a expressão de comportamentos reprodutivos e monitorando as aferências sensoriais do meio ambiente faz do ciclo um processo neuroendócrino (SCHWARTZ, 2000). Durante o ciclo estral as secreções ovarianas variam (SMITH; FREEMAN; NEILL, 1975) e preparam o trato reprodutivo para receber o óvulo (FREEMAN, 1994; SCHWARTZ, 2000). É possível que a elevação da concentração de Ang II circulante nas ratas clampeadas possa estar promovendo uma alteração na relação receptores  $AT_1/AT_2$  no ovário, e assim resultando em alterações no ciclo estral. GOOYER et al. (2004) ao verificarem o desenvolvimento folicular em ratas hipertensas transgênicas (mRen-2)<sup>27</sup>, as quais exibem elevadas concentrações séricas de pró-renina, e renina extra-renal e angiotensina I em sítios que normalmente se caracterizam por expressar baixas quantidades destes, e em ratas *Sprague-Dawley* que sofreram infusão de Ang II por 12-14 dias, evidenciaram redução da expressão do RNAm para o receptor  $AT_{1A}$  e nenhuma

modificação para o receptor AT<sub>2</sub> nestes animais. Desta forma, a maior disponibilidade de receptores AT<sub>2</sub> no ovário poderia ser a responsável pela menor secreção de estradiol, já que o receptor AT<sub>2</sub> está envolvido na redução da secreção ovariana deste hormônio (KOTANI et al., 1999), e portanto, faria com que as ratas 2R/1C-H e 2R/1C permanecessem nos primeiros dias após a cirurgia, persistentemente em diestro, fase onde verifica-se baixas concentrações de esteróides gonadais e de gonadotrofinas (BUTCHER; COLLINS; FUGO et al., 1974; SMITH; FREEMAN; NEILL, 1975; FREEMANN, 1994). Contrariamente, conforme verificado em nosso estudo, no perfil hormonal obtido na tarde do proestro em ratas clipadas e FICT, distúrbios relativos ao ciclo estral não se deve a alterações na esteroidogênese ovariana, já que os animais 2R/1C não apresentaram modificação no perfil de secreção para o estradiol na tarde do proestro. Mas, estes resultados foram obtidos de ratas 2R/1C-H e 2R/1C que já apresentavam mudanças nas fases do ciclo estral, e não de ratas que estavam sem ciclar, portanto, estudos futuros analisando a concentração plasmática de estradiol num período mais curto após a cirurgia, poderão confirmar a hipótese anteriormente citada.

Ao avaliarmos as concentrações de LH e FSH na tarde do proestro em ratas 2R/1C-H e 2R/1C, verificamos que a concentração plasmática de LH no grupo hipertenso, às 16:00h, encontrava-se menor em relação aos demais grupos, porém, o conteúdo total de LH na tarde do proestro (Figura; 16) não foi alterado. Fisiologicamente, o pico de LH nos animais 2R/1C-H parece ter um atraso em relação aos demais grupos, sendo verificado às 18:00h, enquanto nos animais FICT e 2R/1C é observado às 17:00h. Já o padrão da concentração plasmática de FSH foi semelhante entre os grupos estudados (Figura: 17).

Sabe-se que a elevação plasmática de LH no proestro é fundamental para os eventos que culminarão com a ovulação (SCHWARTZ, 2000). O pico pré-ovulatório de LH depende da secreção de LHRH do hipotálamo, processo este, que por sua vez depende da retroalimentação positiva do estradiol e sinais neurais que iniciam a elevação plasmática de gonadotrofinas (LEVINE, 1997). A Ang II central está envolvida no controle da secreção de LH (STEELE et al., 1981; STEELE & GANONG, 1986; PHILLIPS et al., 1993; GHAZI et al., 1994). Evidências experimentais indicam que há elevação nas concentrações de Ang II cerebrais já na quarta semana após colocação do clipe na artéria renal (MORISHITA et al., 1993). Assim, mesmo sendo evidenciado que nos horários estudados o conteúdo total de estradiol, FSH e LH na tarde do proestro não encontram-se alterados, não podemos descartar que as mudanças nas concentrações de Ang II, neste modelo experimental, podem estar levando a um distúrbio no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, principalmente nos primeiros dias após a cirurgia interferindo no perfil hormonal em ratas clipadas, e portanto no ciclo estral.

### **3. Comportamento Sexual**

Na noite do proestro, as ratas apresentam receptividade sexual decorrente do aumento de estradiol e progesterona que atuam em estruturas do SNC (PFAFF; VASUDEVAN; ATTARDI, 2000). Em nosso trabalho, ratas hipertensas em proestro apresentaram redução no quociente de lordose, efeito que não é decorrente de problemas motores nestes animais, pois a frequência e a duração de locomoção durante o registro dos parâmetros comportamentais não foram alteradas (Figura: 11A e 11B). Além disso,

a redução da lordose em ratas não se deve a problemas na esteroidogênese ovariana, já que nossas ratas não apresentaram alteração no perfil de secreção para o estradiol na tarde do proestro (Figura: 13).

BREIGEIRON (2005) verificou que em ratos com hipertensão renovascular há uma redução da frequência de monta com intromissão, prolongada latência para iniciar a monta com intromissão, longos intervalos entre monta com intromissão e ejaculação e aumento da duração do intervalo pós-ejaculatório, com diminuição do número de animais que ejaculam e que retomam a atividade sexual após a ejaculação, quando comparados aos ratos do grupo FICT.

Diversos estudos epidemiológicos com mulheres e homens demonstraram que pacientes hipertensos apresentam disfunção sexual (LEWIS et al., 1998; DUNCAN et al., 2000; MOREIRA et al., 2001; FERRARIO & LEVY, 2002; SASAYAMA et al., 2003; FOGARI et al., 2004). No presente estudo, nas fêmeas com hipertensão renovascular, um possível efeito inibitório direto e indireto da Ang II no MeA, APOM, VMH, e PAG, regiões que são importantes para o comportamento de lordose em ratas (RAJENDREN; DUDLEY; MOSS, 1991; RAJENDREN & MOSS, 1993; BEHBEHANI, 1995; PFAFF; VASUDEVAN; ATTARDI, 2000), pode ser o fator que esteja reduzindo a receptividade nestes animais.

A Ang II é reconhecida como um fator importante na patogênese da hipertensão experimental e clínica (DeFORREST et al., 1982; MARTINEZ-MALDONADO, 1991; NISHIMURA et al., 1992; KAGIYAMA et al., 2001). O modelo de hipertensão renovascular é caracterizado por apresentar elevadas concentrações plasmáticas de Ang II (RUCKIZA & LEENEN, 1994), e já na quarta semana após a estenose da artéria renal

a Ang II central apresenta-se elevada (MORISHITA et al., 1993). Estudos evidenciaram que microinjeções icv de Ang II inibem o comportamento sexual em machos (CLARK, 1989) sendo este efeito mediado pelo receptor AT<sub>1</sub> (CLARK & KEATON, 1998). Também, microinjeções de Ang II no núcleo MeA diminuem o comportamento sexual em ratos machos (BREIGEIRON et al., 2002) e fêmeas (CECCONELLO, 2005).

Além do possível efeito inibitório da elevação da concentração da Ang II central sobre o comportamento sexual na rata hipertensa, especulamos uma provável ação inibitória da Ang II periférica sobre o reflexo de lordose na rata hipertensa, com base nas seguintes evidências: a) o órgão subfornicial (SFO) - órgão circumventricular - possui receptores para Ang II circulante (LENKEI et al., 1997); b) o SFO envia projeções para o núcleo pré-óptico mediano (MnPO) (KOLAJ; BAI; RENAUD, 2004), que também é ricamente innervado por terminações nervosas imunorreativas à Ang II, cujas aferências provém do SFO (LIND; SWANSON; GANTEN, 1985). O MnPO está relacionado com o controle da ingesta hídrica, cardiovascular (LENKEI et al., 1997), e função reprodutiva (BHAT et al., 1995); c) o MnPO envia eferências para o núcleo paraventricular (PVN) (TANAKA et al., 1993a; STOCKER & TONEY, 2005); d) além disso, o SFO em resposta à Ang II também apresenta projeções diretas para o PVN (TANAKA et al., 1985). Sugerimos portanto, que a Ang II periférica elevada, que caracteriza o modelo de hipertensão renovascular usado em nosso trabalho, através das duas vias citadas acima, não somente contribua para o controle da ingesta hídrica e cardiovascular, como está bem estabelecido (TANAKA et al., 1993a; TANAKA & NOMURA, 1993; TANAKA et al., 1993b; STOCKER & TONEY, 2005), mas que possa estar envolvida na redução do comportamento de lordose, pelo fato de se saber

que: a) existem projeções do PVN para o núcleo MeA (OLMOS; BELTRAMINO; ALHEID, 2004); b) o núcleo MeA é importante no comportamento sexual da rata, por enviar eferências tanto para a APOM quanto VMH (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995), e sua ativação não só estimula o VMH (SAKUMA & PFAFF, 1982), como também promove a lordose (MASCÓ & CARRER, 1980); c) e que segundo SWANSON & PETROVICH (1998) o núcleo MeA possui neurônios gabaérgicos, sugerindo que suas eferências são predominantemente gabaérgicas. Desta forma, Ang II elevada ativando esta circuitaria, poderia estar aumentando as saídas inibitórias do núcleo MeA para a APOM, reduzindo portanto, a lordose na rata hipertensa, mesmo sob concentrações adequadas de estradiol como pode ser verificado no perfil plasmático na tarde do proestro para este hormônio nos animais 2R/1C-H.

A APOM é uma região importante no comportamento sexual da rata (KATO & SAKUMA, 2000), participa na inibição tônica da lordose (TAKEO; CHIBA; SAKUMA, 1993) quando há baixas concentrações de estrógeno, enviando projeções inibitórias para a PAG e área tegmental ventral do mesencéfalo (ARENDASH & GORSKI, 1983; HASEGAWA et al., 1991; SAKUMA, 1994). É possível que um efeito inibitório do núcleo MeA sobre a resposta sexual, seja dado por neurônios gabaérgicos do núcleo MeA, que fazem sinapse com neurônios da APOM, impedindo-os de responderem ao estrógeno (SAKUMA, 1994).

Por outro lado, a redução do comportamento sexual em machos com hipertensão renovascular tratados com nifedipina que normaliza a pressão arterial, mas não interfere nas concentrações plasmáticas de Ang II, apresentam um padrão normal de comportamento sexual (BREIGEIRON, 2005). Assim, efeitos da pressão arterial

sistêmica sobre o comportamento sexual, e não do aumento da Ang II, não podem ser descartados como os responsáveis pela redução do comportamento de receptividade na rata submetida ao clameamento da artéria renal. A PAG, região do mesencéfalo em torno do aqueduto cerebral, cuja estimulação diretamente ativa neurônios que se projetam para medula espinhal, ativando motoneurônios dos músculos dorsais responsáveis pela lordose, também está envolvida no controle autonômico (BEHBEHANI, 1995). Segundo BEHBEHANI (1995) existe uma integração das funções da PAG, dentre elas interação das regiões envolvidas com o comportamento de lordose e regulação autonômica. Portanto, a proximidade das áreas envolvidas no controle cardiovascular e comportamento sexual na rata, pode na hipertensão levar à ruptura na execução apropriada do comportamento sexual.

#### **4. Ovulação**

Nossos resultados demonstraram que ratas 2R/1C-H e 2R/1C apresentam uma redução no número de óvulos. Apesar de haver poucos dados na literatura que verificaram a ovulação em ratas hipertensas, nossos resultados corroboram com os de HASHIMOTO & KIMURA (1989), os quais verificaram que ratas espontaneamente hipertensas apresentam menor número de óvulos quando comparado a ratas *Wistar-Kyoto*.

Sabe-se que o aumento no LH plasmático no proestro é o evento chave para que ocorra a ovulação. O LH promove retorno da meiose do ovócito e enfraquece a parede de células em torno dos folículos permitindo expansão deste, e finalmente, a ovulação

(SCHWARTZ, 2000). Em nosso trabalho a redução do número de óvulos em ratas 2R/1C-H não foi relacionada à alteração no conteúdo total de LH na tarde do proestro, porém houve uma alteração no perfil de secreção para LH, sendo evidenciada uma menor concentração plasmática de LH às 16:00h em relação aos demais grupos, e que assim como verificado por HASHIMOTO E KIMURA (1989) em ratas espontaneamente hipertensas, o pico plasmático de LH parece apresentar um atraso em relação às ratas FICT e 2R/1C. Esta modificação do perfil plasmático de LH, associada aos valores normais de estradiol, indica um possível efeito central da Ang II e/ou dos mecanismos de regulação da pressão sobre a secreção de LH, que poderiam estar contribuindo para a redução do número de óvulos em ratas 2R/1C-H.

A redução do número de óvulos em ratas 2R/1C-H, verificada neste estudo, também pode ser associada à elevação da concentração de Ang II circulante que caracteriza este modelo (RUZICKA & LEENEN, 1994; NAVAR et al., 1998), pois, em ratas hipertensas transgênicas (mRen-2)<sup>27</sup>, e em ratas *Sprague-Dawley* que foram submetidas à infusão com Ang II por 12-14 dias, ocorre uma redução no número de folículos antrais grandes e folículos pré-ovulatórios (GOOYER et al., 2004), e além disso como já mencionado, verifica-se redução da expressão do RNAm para o receptor AT<sub>1A</sub> no ovário, sem alteração para o receptor AT<sub>2</sub> (GOOYER et al., 2004). O receptor AT<sub>1A</sub> está envolvido com crescimento celular e propriedades angiogênicas da Ang II (CHUNG et al., 1998). Pode ser que nestes sítios a Ang II influencie processos como fluxo sanguíneo, vascularização, crescimento dos folículos via AT<sub>1A</sub> (GOOYER et al., 2004). Por outro lado, o AT<sub>2</sub> está envolvido com apoptose, e formação de folículos atrésicos (SPETH; DAUBERT; GROVE, 1999; KOTANI et al., 1999). Portanto, a

elevação na concentração plasmática de Ang II no modelo de hipertensão utilizado em nosso estudo, pode também estar resultando numa menor razão receptor  $AT_1/AT_2$  no ovário, o que levaria a redução na maturação folicular, menor número de folículos pré-ovulatórios, e conseqüentemente menor número de óvulos liberados. Assim, a redução da ovulação em ratas 2R/1C-H, mesmo apresentando conteúdo total de LH e FSH normal na tarde do proestro, quando comparado ao grupo FICT, pode ser devido a problemas no ovário, possivelmente quanto à relação receptor  $AT_1/AT_2$ , que resultaria em uma maior formação de folículos atresícos.

É necessário ressaltar que um dos determinantes da redução do número de óvulos nas ratas 2R/1C-H pode ser a possível ruptura na integridade do SRA ovariano nestes animais, já que este sistema é importante para a ovulação (PELLICER et al., 1988; YOSHIMURA et al., 1992; SAHIN et al., 1997) e esteroidogênese (BUMPUS et al., 1988). Como verificado por GOOYER et al. (2004), a infusão de Ang II por 12-14 dias em ratas promove redução da concentração de renina ovariana, o que se refere ao clássico *feedback* negativo da Ang II sobre a secreção de renina, como por exemplo a ação da Ang II via  $AT_1$  reduzindo a secreção de renina renal (MATSUSAKA & ICHIKAWA, 1997). Sugerimos que nos animais 2R/1C-H, este mecanismo de *feedback* negativo sobre a renina ovariana esteja acontecendo, e desta forma, menor produção de Ang II no micromeio do ovário e conseqüentemente redução da ovulação.

Outro aspecto importante a considerar, quanto à redução do número de óvulos, é que em nosso trabalho o perfil de secreção para o FSH na tarde do proestro para ratas 2R/1C-H não foi alterado (Figura: 17). Este resultado corrobora com a possibilidade de que alterações quanto à ação do FSH e à ligação do LH a seus receptores no ovário,

pode estar reduzindo a ovulação nas ratas hipertensas, pois o FSH induz a maturação folicular elevando o conteúdo de receptores para LH (FINK, 2000; SCHWARTZ, 2000). Os folículos pré-ovulatórios apresentando aumento nos níveis de receptores para LH estão aptos a ser liberados (KOTANI et al., 1999) em resposta ao pico de LH que ocorre na tarde do proestro (BUTCHER; COLLINS; FUGO et al., 1974; SMITH; FREEMAN; NEILL, 1975; FREEMANN, 1994). Como verificaram KOTANI et al. (1999) a cultura de células da granulosa na presença de FSH (50 ng/mL) e Ang II (100nM) de ratas tratadas com *diethylstilbestrol*, reduziu o aumento da ligação de <sup>125</sup>I-gonadotrofina coriônica humana ao receptor de LH, e esta supressão do efeito do FSH, foi revertida pelo antagonista do receptor AT<sub>2</sub>, PD-123319.

Outra ação possível que contribuiria para a redução do número de óvulos nos animais 2R/1C-H, seria a diminuição do fluxo sangüíneo para o ovário. Nosso modelo de hipertensão caracteriza-se pela elevação da Ang II, potente peptídeo vasoconstritor (FITZSIMONS, 1998). Sabe-se que na hipertensão a elevação da pressão arterial é sustentada por várias ações dentre elas vasoconstrição arteriolar (RUZICKA & LEENEN, 1994; NAVAR et al., 1998). A vasoconstrição nas artérias do ovário pode estar afetando o fluxo sangüíneo ovariano e assim em déficit do número de óvulos liberados, pois como sugerido por ACOSTA & MIYAMOTO (2004), no ovário o aumento do fluxo sangüíneo para a camada de células em torno dos folículos ovulatórios pode participar no aumento do suprimento de gonadotrofinas, nutrientes, hormônios e outros componentes sangüíneos importantes para a ovulação.

Com relação à redução do número de óvulos no grupo 2R/1C, sugerimos que a redução do fluxo sangüíneo renal devido a colocação do clipe, e aumento da secreção de

renina e conseqüente elevação da concentração plasmática de Ang II nos primeiros dias após a cirurgia, pode ter resultados que se verificam a longo prazo, já que fisiologicamente a redução do número de óvulos é mais acentuada nas 2R/1C-H, enquanto as 2R/1C parecem estar num período de restabelecimento à valores normais. Esta redução no número de óvulos nos animais 2R/1C possibilita especular que a redução do fluxo sangüíneo, e nível sistêmico de pressão arterial podem não estar diminuindo a ovulação nos animais hipertensos, e sim que este desfecho sobre a ovulação possa ser dependente da concentração de Ang II.

Nossos resultados demonstram que a hipertensão renovascular está relacionada com disfunção sexual em fêmeas, e que esta pode ser decorrente da concentração de Ang II circulante e/ou da elevação da pressão arterial sistêmica. Cabe salientar a necessidade de estudos complementares que verifique o desenvolvimento folicular em ratas que foram submetidas ao clampeamento da artéria renal e que desenvolveram ou não hipertensão. Além disso, avaliar as concentrações plasmáticas de FSH na madrugada do estro, assim como a quantificação da concentração plasmática e central de Ang II, renina plasmática e ovariana. Esses dados futuros contribuiriam para responder, em parte, o porquê de ratas 2R/1C-H apresentarem redução na capacidade reprodutiva, e dos animais 2R/1C-H e 2R/1C apresentarem semelhanças nos parâmetros: regularidade do ciclo estral e ovulação.

**CONCLUSÕES**

---

A interpretação dos resultados deste trabalho encaminham para as seguintes conclusões:

- A implantação do clipe na artéria renal esquerda desenvolveu hipertensão em 55% das ratas.
- A hipertensão renovascular reduz a capacidade reprodutiva de fêmeas, como verificado pela redução do número de ratas que ciclam regularmente, diminuição do comportamento de lordose e ovulação.
- Há prejuízos semelhantes com relação à regularidade do ciclo estral e ovulação em ratas 2R/1C-H e 2R/1C, porém fisiologicamente os animais 2R/1C parecem estar retornando a regularidade dos parâmetros acima citados.
- Os prejuízos sobre a função reprodutiva nas ratas clipadas não se deve à alteração na esteroidogênese ovariana e secreção de FSH na tarde do proestro.

- A Ang II e/ou o estado hipertensivo, pode estar mediando muitas das alterações comportamentais, endócrinas e vasculares importantes no processo reprodutivo.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---

ACOSTA, T.J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Anim. Reprod. Sci.**, v.82-83, p.127-140, 2004.

ANSELMO-FRANCI, J.A.; FRANCI, C.R.; KRULICH, L.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; McCANN, S.M. Locus Coeruleus lesions decrease norepinephrine input into the medial preoptic area and medial basal hypothalamus and block LH, FSH and prolactin preovulatory surge. **Brain Res.**, v.767, p.289-296, 1997.

ARENDASH, G.W.; GORSKI, R.A. Suppression of lordotic responsiveness in the female rat during mesencephalic electrical stimulation. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.19, p.351-357, 1983.

ARIMA, S. Role of angiotensin II and endogenous vasodilators in the control of glomerular hemodynamics. **Clin. Exp. Nephrol.**, v.7, p.172-178, 2003.

AUGER, A.P. Ligand-independent activation of progestin receptors: relevance for female sexual behaviour. **Reproduction**, v.122, p.847-855, 2001.

BEHBEHANI, M.M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Prog. Neurobiol.**, v.46, p. 575-605, 1995.

BHAT, G.K.; MAHESH, V.B.; LAMAR, C.A.; PING, L.; AGUAN, K.; BRANN, D.W. Histochemical localization of nitric oxide neurons in the hypothalamus: association with gonadotropin-releasing hormone neurons and co-localization with N-methyl-D-aspartate receptors. **Neuroendocrinology**, v.62, p.187-197, 1995.

BICKERTON, R.K.; BUCKLEY, J.P. Evidence for a central mechanism of Angiotensin induced hypertension. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.106, p.834-6, 1961.

BOTTARI, S. P.; GASPARO, M.; STECKELINGS, U. M.; LEVENS, N. R. Angiotensin II receptor subtypes: characterization, signalling mechanisms and possible physiological implications. **Front. Neuroendocrinol.**, v.14(2), p.123-71, 1993.

BREIGEIRON, M.K.; MORRIS, M.; LUCION A.B.; SANVITTO, G.L. Effects of angiotensin microinjected into medial amygdala on male sexual behavior in rats. **Horm. Behav.**, v.41, p.267-74, 2002.

BREIGEIRON, M.K. Efeitos da hipertensão renovascular sobre a função reprodutiva de ratos machos Wistar. **Tese** (Doutorado em Fisiologia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

BUCCAFUSCO, J.J. The role of cholinergic neurons in the regulation of blood pressure and in experimental hypertension. **Pharmacol. Rev.**, v.48(2): p.179-211, 1996.

BUMPUS, F.M.; PUCELL, A.G.; DAUD, A.I.; HUSAIN, A. **Am. J. Med. Sci.**, v.295(4), p.406-408, 1988.

BUTCHER, R.L.; COLLINS, W.E.; FUGO, N.W. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 $\beta$  throughout the 4-day estrous cycle of the rat. **Endocrinology**, v.94, p.1704-1708, 1974.

CANTERAS, N.S.; SIMERLY, R.B.; SWANSON, L.W. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v.360, p.213-245, 1995.

CARRETERO, O.A.; OPARIL, S. Essential hypertension Part I: Definition and etiology. **Circulation**, v.101, p.329-335, 2000.

CECCONELLO, A.L. A microinjeção de angiotensina II na amígdala medial reduz o comportamento sexual em ratas. **Dissertação** (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

CHABBERT-BUFFET, N.; SKINNER, D.C.; CARATY, A.; BOUCHARD, P. Neuroendocrine effects of progesterone. **Steroids**, v.65, p.613-620, 2000.

CHUNG, O.; KUHL, H.; STOLL, M.; UNGER, T. Physiological and pharmacological implications of T1 versus AT2 receptors. **Kidney Inter.**, v.67, S95-S99, 1998.

CLARK, J. T. A possible role for angiotensin II in the regulation of male sexual behavior in rats. **Physiol. Behav.**, v.45, p.221-46, 1989.

CLARK, J.T. Sexual function in altered physiological states: comparison of effects of hypertension, diabetes, hyperprolactinemia, and others to “normal” aging in male rats. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.19(2), p. 279-302, 1995.

DeFORREST, J.M.; KNAPPENBERGER, R.C.; ANTONACCIO, M.J.; FERRONE, R.A. CREEKMORE, J.S. Angiotensin II is a necessary component for the development of hypertension in the two kidney, one clip rat. **Am. J. Cardiol.**, v.49, p.1515-7, 1982.

DORNELLES, R.C.M.; FRANCI, C.R. Action of AT<sub>1</sub> subtype angiotensin II receptors of the medial preoptica area on gonadotropins and prolactin release. **Neuropeptides**, v.32, p.51-55, 1998.

DUDLEY, C.A.; RAJENDREN, G.; MOSS, R.L. Signal processing in the vomeronasal system: modulation of sexual behaviour in female rat. **Crit. Rev. Neurobiol.**, v.10(3-4), p.265-290, 1996.

DUNCAN, L.; BATEMAN, D.N. Sexual function in women. Do antihypertensive drugs have an impact? **Drug Saf.**, v.8(3), p.225-234, 1993.

DUNCAN, L.E.; LEWIS, C.; JENKINS, P.; PEARSON, T.A. Does hypertension and its pharmacotherapy affect the quality of sexual function in women? **Am. J. Hypertens.**, v.13, p.640-647, 2000.

FERNANDEZ, S.F.; HUANG, M-H; DAVIDSON, B.A.; KNIGHT III, P.R. & IZZO, J.L.J. Modulation of Angiotensin II responses in sympathetic neurons by cytosolic calcium. **Hypertension**, v.41, p.56-63, 2003.

FERRARIO, C.M.; LEVY, P. Sexual dysfunction in patients with hypertension: implications for therapy. **J. Clin. Hypertens.** (Greenwich), v.4(6), p. 424-432, 2002.

FINK, G. Neuroendocrine regulation of reproductive cyclicity. In: Ed CONN, P.M. & FREEMAN, M.E., **Neuroendocrinol. Physiol. Med.** Human Press., p.135-145, 2000.

FITZSIMONS, J.T. Angiotensin Stimulation of the Central Nervous System. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, v.87, p.117-259, 1980.

FITZSIMONS, J. T. Angiotensin, thirst and sodium appetite. **Physiol. Rev.**, v.78(3), p.583-686, 1998.

FLANAGAN-CATO, L.M. Estrogen-induced remodeling of hypothalamic neural circuitry. **Front. Neuroendocrinol.**, v.21. p.309-329, 2000.

FLANAGAN-CATO, L.M.; CALIZO, L.H.; DANIELS, D. The synaptic organization of VMH neurons that mediate the effects of estrogen on sexual behaviour. **Horm. Behav.**, v.40, p.178-182, 2001.

FOGARI, R.; PRETI, P.; ZOPPI, Z.; CORRADI, L.; PASOTTI, C.; RINALDI, A.; MUGELLINI, A. Effect of valsartan and atenolol on sexual behavior in hypertensive postmenopausal women. **Am. J. Hypertens.**, v.17, p.77-81, 2004.

FREEMAN, M.E. The ovarian cycle of the rat. In: KNOBIL, E. & NEILL, J. (eds), **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, p.613-647, 1994.

GALLI, S.M.; PHILLIPS, M.I. Angiotensin II AT<sub>1A</sub> receptor antisense lowers blood pressure in acute 2-kidney, 1-clip hypertension. **Hypertension**, v.38(2), p.674-678, 2001.

GANONG, W.F. Blood, pituitary, and brain renin-angiotensin systems and regulation of secretion of anterior pituitary gland. **Front. Neuroendocrinol.**, v.14(3), p.233-249, 1993.

GANONG, W.F. Reproduction and the renin-angiotensin system. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.19(2), p.241-250, 1995.

GASPARO, M.; CATT, K.J.; INAGAMI, T.; WRIGHT, J.W.; UNGER, T.H. International union of pharmacology. The Angiotensin II receptors. **Pharmacol. Rev.**, v.52(3), p.415-472, 2000.

GHAZI, N.; GROVE, K.L.; WRIGHT, J.W.; PHILLIPS, M.I.; SPETH, R.C. Variations in angiotensin-II release from the rat brain during the estrous cycle. **Endocrinology**, v.135, p.1945-1950, 1994.

GIORGI, D.M.A. Temas em Cardiologia: Hipertensão. **Socesp**, v.01, p.1-48, 2005.

GOLDBLATT, H.; LYNCH, J.; HANZAL, R.F.; SUMERVILLE, W.W. Studies on experimental hypertension. I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. **J. Exp. Med.**, v.59, p.347-79, 1934.

GOMES, C.M.; FRANTZ, P.J.; SANVITTO, G.L.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; LUCION, A.B. Neonatal handling induces anovulatory estrous cycles in rats. **Braz. J. Medical Biol. Res.**, v.32, p.1239-1242, 1999.

GOOYER, T.E de; SKINNER, S.L; WLODEK, M.E.; KELLY, D.J.; WILKINSON-BERKA, J.L. Angiotensin II influences ovarian follicle development in the transgenic (mRen-2)<sup>27</sup> and Sprague-Dawley rat. **J. Endocrinol.**, v.180, p.311-324. 2004.

HARMS, P. G.; OJEDA, S.R. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. **J. Appl. Physiol.**, v.36, 391-392, 1974.

HASEGAWA, T.; TAKEO, T.; AKITSU, H.; HOSHINA, Y.; SAKUMA, Y. Interruption of the lordosis reflex of female rats by ventral midbrain stimulation. **Physiol. Behav.**, v.50, p.1033-1038, 1991.

HASHIMOTO, R.; KIMURA, F. Puberty and ovulatory release of gonadotropins in spontaneously hypertensive rats. **Endocrinol. Japon.**, v.36(5), p.675-680, 1989.

HERBISON, A.; HORVATH, T.L.; NAFTOLIN, F.; LERANTH, C. Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in monkey hypothalamus: relationship to neurons containing luteinizing hormone-releasing hormone and tyrosine hydroxylase. **Neuroendocrinology**, v.61, p.1-10, 1995.

ICHIKI, T.; LABOSKY, P.A.; SHIOTA, C.; OKUYAMA, S.; IMAGAWA, Y.; FOGO, A.; NIIMURA, F.; ICHIKAWA, I.; HOGAN, B.L.; INAGAMI, T. Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type 2 receptor. **Nature**, v.377(6551), p.748-50, 1995.

JENNES, L.; JENNES, M.E.; PURVIS, C.; NEES, M. c-fos expression in noradrenergic A<sub>2</sub> neurons of the rat during the estrous cycle and after steroid hormone treatments. **Brain Res.**, v.586, p.171-175, 1992.

JÖHREN, O.; SAAVEDRA, J.M. Expression of AT1A and AT1B angiotensin II receptor messenger RNA in forebrain of 2-week-old rats. **Am. J. Physiol.**, v.271, p.E104-E112, 1996.

JUNG, J-Y.; LEE, J-U.; KIM, W-J. Enhanced activity of central adrenergic neurons in two-kidney, one clip hypertension in Sprague-Dawley rats. **Neurosci. Lett.**, v.369, p.14-18, 2004.

KAGIYAMA, S.; VARELA, A.; PHILLIPS, M.I.; GALLI, S.M. Antisense inhibition of brain renin-angiotensin system decreased blood pressure in chronic 2-kidney, 1 clip hypertensive rats. **Hypertension**, v.37(2), p.371-7, 2001.

KATO, A.; SAKUMA, Y. Neuronal activity in female rat preoptic area associated with sexual motivated behavior. **Brain Res.**, v.862, p.90-102, 2000.

KATO, J.; VILLEE, A.C. Preferential uptake of estradiol by the anterior hypothalamus of the rat. **Endocrinology**, v.80(4), p.567-575, 1967.

KEATON, A.K.; CLARK, J. Effects of angiotensin II on sexual function, blood pressure and fluid intake are differentially affected by AT<sub>1</sub> receptor blockade. **Physiol. Behav.**, v.64, p.339-346, 1998.

KELLY, D.D. Sexual differentiation of the nervous system. In: KANDEL, E.; SCHWARTZ, J.H. & JESSEL, T.M., eds. **Principles of Neural Sciences**. New York: Elsevier, p.959-73, 1991.

KOBORI, H.; HARRISON-BERNARD, L.M.; NAVAR, G. Expression of angiotensinogen mRNA and protein in angiotensin II-dependent hypertension. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 12, p. 431-439, 2001.

KOLAJ, M.; BAI, D.; RENAUD L.P. GABAB receptor modulation of rapid inhibitory and excitatory neurotransmission from subfornical organ and other afferents to median preoptic nucleus neurons. **J. Neurophysiol.**, v.92, p.111-122, 2004.

KOTANI, E.; SUGIMOTO, M.; KAMATA, H. FUJII, N.; SAITOH, M.; USUKI, S.; KUBO, T.; SONG, K.; MIYAZAKI, M.; MURAKAMI, K.; MIYAZAKI, H. Biological

roles of angiotensin II via its type 2 receptor during rat follicle atresia. **Am. J. Physiol.**, v. 276(Endocrinol. Metab.39), p. E25-E33, 1999.

KRETTEK, J.E.; PRICE, J.L. Amygdaloid projections to subcortical structures within the forebrain and the brainstem in the rat and cat. **J. Comp. Neurol.**, v.178, p.225-254, 1978.

LENKEI, Z.; PALKOVITS, M.; CORVOL, P.; LLORENS-CORTES, C. Expression of angiotensin type-1 (AT<sub>1</sub>) and type-2 (AT<sub>2</sub>) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. **Front. Neuroendocrinol.**, v.18(4), p.383-439, 1997.

LEVINE, J.E.; CHAPPELL, P.E.; SCHNEIDER, J.S.; SLEITER, N.C.; SZOBO, M. Progesterone receptors as neuroendocrine integrators. **Front. Neuroendocrinol.**, v.22, p.69-106, 2001.

LEWIS, C.; DUNCAN, L.E.; BALANCE, D.I.; PEARSON, T.A. Is sexual dysfunction in hypertensive women uncommon or understudied? **Am. J. Hypertens.**, v.11, p.733-735, 1998.

LIBERTUN, C. Caracteres sexuais: regulação neuroendócrina da reprodução. In: CINGOLANI, H.E. & HOUSSAY, A.B., eds., **Fisiologia Humana de Houssay**. Porto Alegre: ArtMed., VIII (53), p.677-694, 2004.

LIND, R.W.; SWANSON, L.W.; GANTEN, D. Organization of angiotensin II immunoreactive cells and fibers in the rat central nervous system: An immunohistochemical study. **Neuroendocrinology**, v.40, p.2-24, 1985.

LONG, J.A.; EVANS, H.M. The oestrous cycle in the rat and its related phenomena. **Mem. Univer. Calif.**, v.6, p.1-148, 1922.

MANI, S.K.; BLAUSTEIN, J.D.; O'MALLEY, B.W. Progesterone receptor function from a behavioral perspective. **Horm. Behav.**, v.31, p.244-255, 1997.

MANI, S. Ligand-independent activation of progestin receptors in sexual receptivity. **Horm. Behav.**, v.40, p.183-190, 2001.

MANI, S. Emerging concepts in the regulation of female sexual behavior. **Scand. J. Psychol.**, v.44, p.231-239, 2003.

MARTINEZ-MALDONADO, M. Pathophysiology of renovascular hypertension. **Hypertension**, v.17, p.707-719, 1991.

MARTINS-AFFERRI, M.P.; FERREIRA-SILVA, I.A.; FRANCI, C.R.; ANSELMO-FRANCI, J.A. LHRH release depends on locus coeruleus noradrenergic inputs to the medial preoptic area and median eminence. **Brain Res. Bull.**, v.61(5), p.521-527, 2003.

MAS, M.C.; GUERRA, M.; DAVIDSON, J.M.; BATTANER, E. Neurochemical correlates of male sexual behavior. **Physiol. Behav.**, v.41, p.341-345, 1987.

MASCÓ, D.H.; CARRER, H.F. Sexual receptivity in female rats after lesion or stimulation in different amygdaloid nuclei. **Physiol. Behav.**, v.34, p.1073-1080, 1980.

MATSUSAKA, T.; ICHIKAWA, I. Biological functions of angiotensin and its receptors. **Annu. Rev. Physiol.**, v.59, p.395-412, 1997.

MATTHEWS, M.K.; KENYON, R. Four-versus five-day estrous cycle in rats: vaginal cycling and pregnancy. **Physiol. Behav.**, v.33, 65-67, 1984.

McGREGOR, D.P.; MURONE, C.; SONG, K.; ALLEN, A.M.; PAXINOS, G.; MENDELSON, F. A.O. Angiotensin II receptor subtypes in the human central nervous system. **Brain Res.**, v.675(1-2), p.231-240, 1995.

McCORMICK, C.M.; FUREY, B.F.; CHILD, M.; SAWYER, M.J.; DONOHUE, S.M. Neonatal sex hormones have “organizational” effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of male rats. **Dev. Brain Res.**, v.105(2), p.295-305, 1998.

MOREIRA, E.D.; ABDO, C.H.N.; TORRES, E.B.; LÔBO, C.F.L.; FITTIPALDI, J.A.S. Prevalence and correlates of erectile dysfunction: results of the Brazilian study of sexual behavior. **Urology**, v.58, p.583-588, 2001.

MORGAN, L.; PIPKIN, F.B.; KALSHEKER, N. Angiotensinogen: molecular biology, biochemistry and physiology. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.28(11), p.1211-22, 1996.

MORISHITA, R.; HIGAKI, J.; OKUNISHI, H.; NAKAMURA, F.; NAGANO, M.; MIKAMI, H.; ISHII, K.; MIYAZAKI, M.; OGIHARA, T. Role of tissue renin angiotensin system in two-kidney, one-clip hypertensive rats. **Am. J. Physiol.**, v.264(33), p.F510-F514, 1993.

NAFTOLIN, F. Understanding the bases of sex differences. **Science**, v.211, p.1263-1264, 1981.

NAVAR, L.G.; ZOU, L.; THUN, A.V.; WANG, C.T.; IMIG, J.D.; MICHELL, K.D. Unraveling the mystery of Goldblatt hypertension. **News Physiol. Sci.**, v.13, p.170-176, 1998.

NISHIMURA, M.; MILSTED, A.; BLOCK, C.H.; BROSNIHAN, K.B.; FERRARIO, C.M. Tissue renin-angiotensin systems in renal hypertension. **Hypertension**, v.20, p.158-67, 1992.

OKUNIEWSKI, R.; DAVIS, E.A.; JARROTT, B.; WIDDOP, R.E. A comparison of the development of renal hypertension in male and female rats. **Clin. Sci.**, v.95, p.445-451, 1998.

OLMOS, J.S.; BELTRAMINO, C.A.; ALHEID, G. Amydala and extended amygdala of the rat: a cytoarchitectonical, fibroarchitectonical, and chemoarchitectonical survey. In Ed G. Paxinos. **The rat nervous system**, 3<sup>a</sup>. ed. Elsevier Academic press, p.509-603, 2004.

PELLICER, A.; PALUMBO, A.; DeCHEMEY, A.H.; NAFTOLIN, F. Blockade of ovulation by an angiotensin antagonist. **Science**, v.240, p.1660-1661, 1988.

PFSAFF, D.W.; VASUDEVAN, N.; ATTARDI, B. Neuroendocrine regulation of sexual behavior. In: Ed CONN PM & FREEMAN ME, **Neuroendocrinology in Physiology and Medicine**. Human Press., p.135-145, 2000.

PHILLIPS, M.I.; SUMMERS, C. Angiotensin II in central nervous system physiology. **Regul. Pept.**, v.78, p.1-11, 1998.

PHILLIPS, M.I.; WANG, H.; KIMURA, B.; REJTMAN, M.; KODURI, P.; KALRA, S.P. Dynamic changes in hypothalamic angiotensin II levels and release in association with progesterone-induced luteinizing hormone surge. **Endocrinology**, v.132, p.1637-1642, 1993.

PILGRIM, C.; REISERT, I. Differences between male and female brains – developmental mechanisms and implications. **Horm. Metab. Res.**, v.24, p.353-9, 1992.

PINTO, Y.M.; PAUL, M.; GANTEN, D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. **Cardiovasc. Res.**, v.39, p.77-88; 1998.

PLUNKETT, L.M.; SAAVEDRA, J.M. Increased Angiotensin II binding affinity in the nucleus tractus solitarius of spontaneously hypertensive rats. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.82, p.7721-7724; 1985.

POLETINI, M.O.; SZAWKA, R.E.; MARCON, R.M.F.; VEIGA, M.D.; FRANCI, C.R.; ANSELMO-FRANCI, J.A. A method to study preovulatory surge of gonadotropins. **Brain Res. Protoc.**, v.12, p.41-48, 2003.

RAJENDREN, G.; DUDLEY, C.A.; MOSS, R.L. Role of the vomeronasal organ in the male-induced enhancement of sexual receptivity in female rats. **Neuroendocrinology**, v.52, p.368-372, 1990.

RAJENDREN, G.; DUDLEY, C.A.; MOSS, R.L. Role of the ventromedial nucleus of hypothalamus in the male-induced enhancement of lordosis in female rats. **Physiol. Behav.**, v.50, p.705-710, 1991.

RAJENDREN, G.; MOSS, R.L. The role of the medial nucleus of amygdala in the mating-induced enhancement of lordosis in female rats: the interaction with luteinizing hormone-releasing hormone neuronal system. **Brain Res.**, v.617, p.81-86, 1993.

ROWE, D.W.; ERSKINE, M.S., c-Fos proto-oncogene activity induced by mating in preoptica area, hypothalamus and amygdala in the female rat: role of afferent input via the pelvic nerv. **Brain Res.**, v.621, p.25-34, 1993.

RUZICKA, M.; LEENEN, F.H.H. Experimental renovascular hipertension: methodological aspects and role of the renin-angiotensin system. In Eds D Ganten & W de Jong. **Handbook of Hypertension**, v.16, Experimental and Genetic Models of Hypertension. Elsevier Science BV, p.49-87, 1994.

SAAVEDRA, J.M. Brain and pituitary angiotensin. **Endocr. Rev.**, v.13(2), p.329-380, 1992.

SAAVEDRA, J.M.; TSUTSUMI, K.; STRÖMBERG, C.; SELTZER, A.; MICHELS, K.; ZORAD, S.; VISWANATHAN, M. Localization, characterization, development and function of brain angiotensin II receptor subtypes. In: RAIZADA, M.K., PHILLIPS, M.I. & SUMNERS, C., eds. **Cellular and Molecular Biology of the Renin-Angiotensin System**, v.14, p.358-78, 1993.

SAAVEDRA, JM. Brain angiotensin II: new developments, unanswered questions and therapeutic opportunities. **Cell. Mol. Neurobiol.**, v.25(3-4), p.485-512, 2005.

SAHIN, Y.; KONTAS, O.; MUDERRIS, I.I.; CANKURTARAN, M. Effects of angiotensin converting enzyme inhibitor cilazapril and angiotensin II antagonist saralasin in ovarian hyperstimulation syndrome in the rabbit. **Gynecol. Endocrinol.**, v.11, p.231-236, 1997.

SAKUMA, Y.; PFAFF, D.W. Properties of ventromedial hypothalamic neurons with axons to midbrain central gray. **Exp. Brain. Res.**, v.46, p.292-300, 1982.

SAKUMA, Y. Estrogen-induced changes in the neural impulse flow from the female rat preoptic region. **Horm. Behav.**, v.28, p.438-444, 1994.

SANVITTO, G.L.; JÖHREN, O.; HÄUSER, W.; SAAVEDRA, J.M. Water deprivation upregulates Ang II AT<sub>1</sub> binding and mRNA in rat subfornical organ and anterior pituitary. **Am. J. Physiol.**, v.273(1 Pt 1), p.E156-63, 1997.

SASAYAMA, S.S.; ISHII, N.; ISHIKURA, F.; KAMIJIMA, G.; OGAWA, S.; KANMATSUSE, K.; KIMOTO, Y.; SAKUMA, I.; NONOGI, H.; MATSUMORI, A.; YAMAMOTO, Y. Men's health study – Epidemiology of erectile dysfunction and cardiovascular disease. **Circ. J.**, v.67, p.656-659, 2003.

SCHRICKER, K.; HOLMER, S.; HAMANN, M.; RIEGGER, G.; KURTZ, A. Interrelation between renin mRNA levels, renin secretion, and blood pressure in two-kidney, on clip rats. **Hypertension**, v.24, p.157-162, 1994.

SCHWARTZ, N.B. Neuroendocrine regulation of reproductive cyclicality. In: Ed CONN, P.M. & FREEMAN, M.E., **Neuroendocrinology in Physiology and Medicine**. Human Press., p.135-145, 2000.

SHIVERS, B.O.; HARLAN, R.E.; MORRELL, J.I.; PFAFF, D.W. Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH immunoreactive neurons. **Nature**, v.304, p.345-347, 1983.

SHUGHRUE, P.J.; BUSHNELL, C.D.; DORSA, D.M. Estrogen receptor messenger ribonucleic acid in female rat brain during the estrous cycle: A comparison with ovariectomized females and intact males. **Endocrinology**, v.131(1), p.381-388, 1992.

SIMERLY, RB. Wired for reproduction: organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain. **Annu. Rev. Neurosci.**, v.25, p.507-536, 2002.

SMITH, M.S.; FREEMAN, M.E.; NEILL, J.D. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: Prolactin, Gonadotropin and Steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. **Endocrinology**, v.96, p.219-226, 1975.

SONG, K.; ALLEN, A.M.; PAXINOS, G.; MENDELSON, F.A. Mapping of angiotensin II receptor subtype heterogeneity in rat brain. **J. Comp. Neurol.**, v.316(4), p. 467-484, 1992.

SPETH, R.C.; DAUBERT, D.L.; GROVE, K.L. Angiotensin II: a reproductive hormone too? **Regul. Pept.**, v.79, p.24-40, 1999.

SPYER, K.M. Central nervous mechanisms contributing to cardiovascular control. **J. Physiol.**, v.474(1), p.1-19, 1994.

STEELE, M.K.; NEGRO-VILAR, A.; McCANN, S.M.. Effects of angiotensin II on in vivo and in vitro release of anterior pituitary hormones in the female rat. **Endocrinology**, v.109, p.893-899, 1981.

STEELE, M.K.; McCANN, S.M.; NEGRO-VILAR, A. Modulation by dopamine and estradiol of the central effects of angiotensin II on anterior pituitary hormone release. **Endocrinology**, v.111, p.722-729, 1982.

STEELE, M.K.; GALLO, R.V.; GANONG, W.F. A possible role for the brain renin-angiotensin system in the regulation of LH secretion. **Am. J. Physiol.**, v.245, p.R805-R810, 1983.

STEELE, M.K.; GANONG, W.F. Effects of catecholamine-depleting agents and receptor blockers on basal and angiotensin II-or norepinephrine-stimulated luteinizing hormone release in female rats. **Endocrinology**, v.119(6), p.2728-2736, 1986.

STEELE, M.K.; GALLO, R.V.; GANONG, W.F. Stimulatory or inhibitory effects of angiotensin II upon LH secretion in ovariectomized rats: a function of gonadal steroids. **Neuroendocrinology**, v.40, p.210-216, 1986.

STEELE, M.K. Effects of angiotensins injected into various brain areas on luteinizing hormone release in female rats. **Neuroendocrinology**, v.46, p.401-405, 1987.

STEELE, M.K.; STEPHENSON, K.N.; MEREDITH, J.M.; LEVINE, J.E. Effects of angiotensin II on LHRH release, as measured by in vivo microdialysis of the anterior pituitary gland of conscious female rats. **Neuroendocrinology**, v.55, p.276-281, 1992.

STOCKER, S.D.; TONEY, G.M. Median preoptic neurons projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus respond to osmotic, circulating Ang II and baroreceptor input in the rat. **J. Physiol.**, v.568(2), p.599-615, 2005.

SWANSON, L.W.; PETROVICH, G.D. What is the amygdala? **Trends Neurosci.**, v.21, p.323-331, 1998.

TAKEO, T.; CHIBA, Y.; SAKUMA, Y. Supression of the lordosis reflex of female rats by efferents of the medial preoptic area. **Physiol. Behav.**, v.53, p.831-838, 1993.

TANAKA, J.; KABA, H.; SAITO, H.; SETO, K. Electrophysiological evidence that circulating angiotensin II sensitive neurons in the subfornical organ alter the activity of hypothalamic paraventricular neurohypophyseal neurons in the rat. **Brain Res.**, v.342, p.361-365, 1985.

TANAKA, J.; NOMURA, M. Involvement of neurons sensitive to angiotensin II in the median preoptic nucleus in the drinking response induced by angiotensin II activation of the subfornical organ in rats. **Exp. Neurol.**, v.119, p.235-239, 1993.

TANAKA, J.; NOMURA, M.; KARIYA, K.; NISHIMURA, J-I.; KIMURA, F. Median preoptic neurons projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus are sensitive to blood pressure changes. **Brain Res.**, v.605, p.338-341, 1993a.

TANAKA, J.; NOJIMA, K.; YAMAMURO, Y., SAITO, H.; NOMURA, M. Responses of subfornical organ neurons projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus to hemorrhage. **Brain Res.**, v.608, p.141-144, 1993b.

TIMMERMANS, P.B.M.W.M.; INAGAMI, T.; SAAVEDRA, J.M.; ARDAILLOU, R.; ROSENFELD, C.R.; MELDENSOHN, F.A.O. Angiotensin receptor subtypes and their

pharmacology. In: CUELLO, A.C. & COLLIER, B., eds., , **Pharmacol. Sci. Perspect.**, Massachusetts, Birkhäuser Boston, p.37-59, 1995.

TSUTSUMI, K.; SAAVEDRA, J. M. Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub>) in the rat brain. **Am. J. Physiol.**, v.261: p.R209-16, 1991.

YOSHIMURA, Y.; KARUBE, M.; KOYAMA, N.; SIOKAWA, S.; NANNO, T.; NAKAMURA, Y. Angiotensin II directly induces follicle rupture and oocyte maturation in the rabbit. **FEBS Lett.**, v.307, p.305-308, 1992.

YOSHIMURA, Y. The ovarian renin-angiotensin system in reproductive physiology. **Front. Neuroendocrinol.**, v.18, p.247-291, 1997.

ZHU, G-Q.; PATEL, K.P.; ZUCKER, I.H.; WANG, W. Microinjection of ANG II into paraventricular nucleus enhances cardiac sympathetic afferent reflex in rats. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v.282, p.H2039-H2045, 2002.