

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

**A ADMINISTRAÇÃO DE ANGIOTENSINA II NA AMÍGDALA
MEDIAL ATENUA O COMPORTAMENTO SEXUAL DE RATOS
MACHOS.**

Márcia Koja Breigeiron

Porto Alegre

1999

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

**A ADMINISTRAÇÃO DE ANGIOTENSINA II NA AMÍGDALA
MEDIAL ATENUA O COMPORTAMENTO SEXUAL DE RATOS
MACHOS.**

Márcia Koja Breigeiron

Orientador

Prof. Dr. Gilberto Luiz Sanvitto

Co-orientador

Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion

Dissertação apresentada ao Curso de Pós -
Graduação em Ciências Biológicas -
Fisiologia, da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, como requisito parcial
para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências Biológicas: Fisiologia.

Porto Alegre

1999

"Vivendo entre os grandes espíritos,
sentimos, pouco a pouco,
que o nosso já não é tão pequeno."

Garcia do Prado

Pensares VI, 1989.

Ao Ricardo que, com carinho, mudou a minha vida

e manteve o incentivo durante o mestrado.

Ao meu pai (in memoriam), meu grande mestre.

À minha mãe, por estar sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Gilberto Luiz Sanvitto, pela orientação, paciência e por acreditar em mim como sua aluna, o que me fez superar muitas dificuldades.

Ao professor Aldo Bolten Lucion, pelo apoio tanto do ponto de vista experimental quanto escrito.

À Dr^a Mariana Morris, pelo empréstimo da substância Losartan e pela idéia original deste trabalho.

Aos colegas de laboratório Rosa Almeida, Angélica Consiglio, Márcia Giovenardi, Maristela Padoin, Cláudia Aguiar, Gabriela Pereira, Erica Hermel, Gabriela Severino, Fabrício Macagnan, Francine Pereira e Isabel Martins que contribuíram com amizade e coleguismo nas mais diversas situações.

Aos demais colegas da iniciação científica do Laboratório de Neurofisiologia do Comportamento, pelo carinho e profissionalismo.

Às alunas de iniciação científica Cármen Gomes (agora mestranda) e Kelly Rodrigues pela eficiência com que colaboraram no início deste estudo.

Ao Alberto Antônio Rasia-Filho pelo empréstimo de alguns artigos e pela oportunidade de esclarecer algumas inquietações relacionadas ao trabalho.

Ao Mário Pereira, e mais recentemente ao Vanderlon, Diego e Anderson pelo cuidado dos animais de forma dedicada e objetiva.

Ao Laboratório de Neuroanatomia pelo empréstimo do vibrátomo para a realização dos cortes histológicos.

Às secretárias da pós-graduação Uíra e Míriam, sempre disponíveis para as soluções de problemas.

A todos os colegas dos demais laboratórios, pelo companheirismo.

Às colegas da Unidade de Terapia Intensiva do Hospital de Clínicas de POA, pela seriedade e apoio nestes dois anos como mestranda.

Ao meu marido, Ricardo, pelo amor e dedicação a mim.

Aos meus pais, pelo grande incentivo ao estudo durante toda a minha formação.

À CAPES, órgão que contribuiu com apoio financeiro.

SUMÁRIO

Abreviaturas.....	viii
Resumo.....	ix
Abstract.....	x
Introdução.....	2
1.1 Angiotensina II.....	3
1.1.1. Histórico e Estrutura Bioquímica.....	3
1.1.2. Receptores de Membrana.....	5
1.1.3. Tipos de Receptores.....	6
1.1.4. Mecanismos de Transdução de Sinal dos Receptores.....	6
1.1.5. Abordagem Farmacológica e Molecular dos Receptores.....	8
1.1.6. Distribuição dos Receptores.....	11
1.1.7. Efeitos Biológicos da Angiotensina II.....	12
1.2 . Organização Neural do Comportamento Sexual.....	17
1.2.1. Comportamento Sexual de Ratos.....	19
2. Hipótese.....	25
3. Objetivo.....	25
4. Material e Método.....	27
4.1. Animais.....	27
4.2. Ambiente Experimental.....	30
4.3. Registro Comportamental.....	31
4.4. Verificação da Localização das Cânulas.....	35
4.5. Protocolo Experimental.....	37

4.6. Expressão dos Resultados.....	38
4.7. Análise Estatística.....	39
5. Resultados.....	41
Frequência de intromissão.....	41
Frequência de monta.....	42
Frequência de exploração dos genitais.....	42
Frequência de locomoção.....	42
Duração de locomoção.....	43
Duração do intervalo pós-ejaculatório.....	43
Latência de monta.....	44
Latência de intromissão.....	45
Latência de exploração dos genitais.....	46
Latência de locomoção.....	46
Latência de ejaculação.....	47
6. Discussão.....	60
7. Conclusões.....	70
8. Referências Bibliográficas.....	72

LISTA DE TABELAS E FIGURAS**MATERIAL E MÉTODO (FIGURAS)****FIGURA I** (Parâmetros comportamentais).....34**FIGURA II** (Esquema em corte coronal de encéfalo de rato)...36**RESULTADOS (FIGURAS)****FIGURA III** (Frequência de Intromissão).....48**FIGURA IV** (Frequência de Monta).....49**FIGURA V** (Frequência de Exploração dos Genitais).....50**FIGURA VI** (Frequência de Locomoção).....51**FIGURA VII** (Duração de Locomoção).....52**FIGURA VIII** (Duração do Intervalo Pós-ejaculatório).....53**RESULTADOS (TABELAS)****TABELA I**

Efeito de diferentes doses de Angiotensina II sobre a latência de diferentes parâmetros comportamentais.....54

TABELA II

Efeito da dose de Angiotensina II 50pg e Losartan 10ng sobre a latência de diferentes parâmetros comportamentais.....55

TABELA III

Efeito da dose de Angiotensina II 50pg e CGP 42112 1 sobre a latência de diferentes parâmetros comportamentais.....56

TABELA IV

Resultados percentuais quanto ao parâmetro comportamental frequência.....57

TABELA V

Resumo geral dos resultados.....58

ABREVIATURAS

- ACTH - hormônio adrenocorticotrópico
- ADH - hormônio anti-diurético
- AMe - núcleo medial da amígdala
- Ang II - angiotensina II
- APOM - área pré-óptica medial
- BO - bulbo olfatório
- CGP - antagonista peptídico CGP 42112
- ECA - enzima conversora de angiotensina
- GMPc - guanina monofosfato cíclico
- icv - intracerebroventricular
- Los - antagonista não-peptídico Losartan
- MAP quinase – Microtubule-associated proteins
(proteinoquinas ativadas por mitógenos)
- OCVs - órgãos circunventriculares
- PP2A - proteína fosfatase 2 A (serina/treonina)
- SNC - sistema nervoso central
- SRA - sistema renina-angiotensina

RESUMO

Este trabalho investiga o papel da angiotensina II (Ang II) sobre o comportamento sexual de ratos machos quando microinjetada no núcleo medial da amígdala (AMe), estrutura límbica implicada na modulação deste comportamento. A Ang II é um hormônio peptídeo que exerce múltiplas ações centrais e periféricas no organismo, entre as quais modula alguns tipos de comportamentos. Também possui dois tipos de receptores conhecidos: AT₁ e AT₂, ambos presentes na AMe. Os competidores da Ang II, o antagonista não-peptídico Du Pont 753 (Losartan) e o antagonista peptídico CGP 42112 possuem alta especificidade aos receptores AT₁ e AT₂ de Ang II, respectivamente. A hipótese deste trabalho é que a Ang II exerce um papel na modulação do comportamento sexual por sua ação direta no núcleo da AMe, podendo esta ação ser devido à interação do peptídeo aos receptores AT₁, AT₂ ou ambos. Para isto, foram utilizados 112 ratos machos Wistar (300-350g) com cerca de três meses de idade, selecionados conforme seu desempenho sexual, submetidos à cirurgia estereotáxica para a canulação objetivando a AMe, e divididos em 3 experimentos: a) 5 grupos com diferentes doses de Ang II: 10pg (n=10), 25pg (n=10), 50pg (n=15), 100pg (n=10), 150pg (n=12); b) 1 grupo com Losartan 10ng (n=10) e 1 grupo com Ang II 50pg e Losartan 10ng (n=10); c) 1 grupo com CGP 42112 1ng (n=10) e 1 grupo com Ang II 50pg e CGP 42112 1ng (n=10). Os três experimentos são comparados a 1 grupo controle – injetados com salina (n=15). As microinjeções das substâncias testadas (0,3 µl) eram realizadas 6 dias após a canulação da AMe e 15 minutos antes do registro do comportamento sexual. Os parâmetros comportamentais estudados foram: locomoção, exploração dos genitais, monta, intromissão, ejaculação e intervalo pós-ejaculatório. Os comportamentos filmados foram transcritos para um programa de computador onde era medida a latência, frequência e duração de cada parâmetro. Os dados foram analisados pelo teste da ANOVA de uma via, comparando-se as médias pelo teste de Newman-Keuls para frequência e duração, e as medianas pelo teste de Kruskal-Wallis para a latência, considerando-se $p < 0,05$. Os resultados mostraram uma diminuição do comportamento sexual na injeção da Ang II, em diferentes doses, em todos os parâmetros comportamentais estudados. Os competidores, Losartan e CGP 42112, reverteram o efeito inibitório da Ang II. Os resultados deste trabalho comprovam a hipótese de que a Ang II exerce um papel na modulação do comportamento sexual de ratos machos, provocando sua inibição quando administrada na AMe, sendo este efeito mediado pelos receptores AT₁ e AT₂.

ABSTRACT

To test the hypothesis that brain angiotensin II is involved in the modulation of sexual behavior, Ang II was microinjected into the medial amygdaloid nucleus (Mea) in male adult rats. Chronic guide cannulae were implanted into the Mea of adult male Wistar adult rats (total n=112) and sexual behavior was observed under different conditions after microinjections of 0,3 μ l of : a) saline solution (n=15); b) different doses of Ang II (10 pg (n=10); 25 pg (n=10); 50 pg (n=15); 100 pg (n=10); 150 pg (n=12)); c) Losartan 10 ng (n=10); d) CGP 1 ng (n=10); e) coinjection of Ang II (50 pg) plus Losartan (10 ng) (n=10) or f) Ang II (50 pg) plus CGP (1 ng) (n=10). Video recording was used to observe male sexual activities of the rats and the data were translated to a computer software that measured the latency, frequency and duration of different parameters of sexual behavior. Data (means \pm SEM for frequency and duration, and median for latency) were analyzed using a one-way ANOVA test. Pos hoc analyzes was performed using the Newman-Keuls test for frequency and duration and Kruskal-Wallis test for latency. Statistic significance was defined as $p < 0.05$. Ang II caused a dose-response inhibition of sexual behavior. Both Losartan (10 ng) and CGP 42112 (1 ng) abolished Ang II (50 pg) induced inhibition on sexual behavior. These results support the hypothesis that central Ang II inhibits the sexual behavior in the male rat and both types of Ang II receptors (AT₁ and AT₂) in Mea are functionally involved in these modulation.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A Angiotensina II (Ang II) exerce múltiplas ações no organismo que podem ocorrer por um efeito periférico diretamente sobre um tecido-alvo ou serem mediadas pelo sistema nervoso central (SNC) (Fitzsimons, 1980). Uma das ações mais estudadas da Ang II é a se que refere ao controle da pressão arterial e ao equilíbrio hídrico-eletrolítico (Howes & Christie, 1998).

A elevação da pressão arterial sistêmica representa um dos problemas de saúde mais comuns, sendo considerada o maior fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares nos estudos epidemiológicos. Na maioria dos pacientes, a hipertensão representa uma síndrome heterogênea na qual múltiplos fatores contribuem para a elevação da pressão arterial sistêmica, com conseqüente aumento do risco de morbidade e mortalidade (Andreoli e cols., 1991). Além do desenvolvimento de doenças cardiovasculares, estudos sugerem uma associação entre a doença hipertensiva e a patogênese da impotência sexual (Greenstein e cols., 1997), como também, uma relação do tratamento anti-hipertensivo com a função sexual de ambos os sexos causando perda da libido, prejuízo da função erétil e ejaculação em homens, e diminuição do orgasmo nas mulheres (Chan e cols., 1999), o que acarreta prejuízo ainda maior na qualidade de vida desses pacientes.

Um dos fatores relacionados à fisiopatologia da hipertensão é o sistema renina-angiotensina-aldosterona que descreve a clássica rota do metabolismo das angiotensinas (Andreoli e cols., 1991; Morgan e cols., 1996).

1.1. Angiotensina II

1.1.1. Histórico e Estrutura Bioquímica:

Angiotensinas são peptídeos derivados de uma proteína precursora angiotensinogênica submetida à clivagem seqüencial de enzimas proteolíticas, ou peptidases, denominadas de angiotensinases (Fitzsimons, 1980). Dentre as angiotensinas biologicamente ativas, a Ang II é a que exerce maior influência homeostática. Estudos prévios relacionam o grupo fenilalanina (Phe), que ocupa a oitava posição na estrutura deste octapeptídeo, como a parte ativa dos análogos da Ang II, sendo que os receptores que mediam as respostas endógenas requerem a presença de um aminoácido nesta posição (Ferrario e cols., 1988).

A síntese da Ang II ocorre pela presença de uma enzima denominada renina que age sobre uma proteína circulante, o angiotensinogênio, clivando a ligação entre os resíduos no terminal amina desta proteína gerando a Ang I. Esta será convertida em Ang II através da ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) que retira os aminoácidos histidina e leucina no C-terminal da Ang I (Fitzsimons, 1980; Wright & Harding, 1992; Morgan e cols., 1996). A quantidade de renina é o principal determinante da taxa de produção de Ang II, porém esta inibe a secreção de renina, sendo este mecanismo de “feed-back” negativo necessário para o controle da síntese da Ang II (Bottari e cols., 1993). A transformação metabólica da Ang II é encontrada em muitos tecidos como na glândula supra-renal, coração, pulmão, rins, hipófise, cérebro e nos vasos sanguíneos (Fitzsimons, 1980; Zhuo e cols., 1998). A

meia-vida desse peptídeo é curta, sendo menor que um ciclo circulatório em animais intactos (Fitzsimons, 1980).

Bickerton & Buckley (1961) descobriram uma resposta tensora neurogênica originada pela Ang II relacionando a estimulação do SNC pelo peptídeo, porém pesquisas objetivando o estudo do comportamento de ingestão hídrica levaram a suposição da existência de um sistema renina-angiotensina (SRA) central independente do SRA periférico. A ação da Ang II sobre o SNC ocorre através da passagem do peptídeo periférico pelos órgãos circunventriculares (OCVs) e do peptídeo sintetizado centralmente (Bottari e cols., 1993; Lenkei e cols., 1997). O SNC contém o material genético para a transcrição molecular de todos os componentes de um SRA local: RNAm para angiotensinogênio (Milsted e cols., 1996; Jo e cols., 1996; Laflamme e cols., 1998; Morgan e cols., 1996), para renina (Shimoike e cols., 1997; Jo e cols., 1996), para ECA (Laflamme e cols., 1998) e para os sítios de ligação da Ang II (Jo e cols., 1996; Sanvitto e cols., 1997), além da presença do angiotensinogênio e da Ang II imunorreativos (MacGregor e cols., 1995, Paul e cols., 1993). A existência de RNAm para os componentes do SRA central, demonstrada através de técnicas de hibridização *in situ*, autoradiografia *in vitro*, imunohistoquímica e por reação da cadeia de transcrição da polimerase reversa (RT-PCR) (Jo e cols., 1996; Shimoike e cols., 1997; Morgan e cols., 1996; Zhuo e cols., 1998) sugere a produção endógena da Ang II, associada aos corpos neuronais (Wright & Harding, 1992; Lenkei e cols., 1997), no sistema límbico, hipotálamo, cerebelo, medula oblonga e espinhal e em muitas outras regiões do SNC (Benarroch & Schmeichel, 1998; Mungall e cols., 1995; Aldred e cols., 1993; Lenkei e cols., 1997; Jo e cols., 1996; Zhuo e cols., 1998).

1.1.2. Receptores de Membrana:

O mecanismo de ação da Ang II ocorre em receptores de membrana (Goodfriend e cols., 1996). Bennet & Snyder (1976) e Sirret e colaboradores (1977) encontraram sítios ligantes de Ang II com uma distribuição heterogênea no cérebro de ratos, bezerros e em humanos. Pesquisas relacionadas à localização dos receptores nos tecidos periféricos demonstraram a existência de diferentes tipos de receptores de Ang II (Peach e cols., 1990), os quais foram subdivididos em dois subgrupos, baseados na multiplicidade das ações fisiológicas e nos sinais dos mecanismos de transdução, assim como nos diferentes mecanismos reguladores da expressão do receptor e no seu potencial agonista / antagonista. Provas conclusivas da existência de diferentes tipos de receptores de Ang II somente foram obtidas após o desenvolvimento de ligandos seletivos para estes receptores (Timmermans e cols., 1995). Os ligandos utilizados foram hábeis em demonstrar a ligação do peptídeo com populações de receptores seletivos em um número de órgãos-alvos periféricos para Ang II (Timmermans e cols., 1995).

Os receptores de Ang II têm características comuns a outros receptores hormonais de superfície celular: sua especificidade estrutural é alta, possuem limitada capacidade de ligação (saturabilidade), têm alta afinidade à ligação com a Ang II, convertendo esta ligação em respostas celulares (sinal de transdução), e são regulados por suas taxas de biossíntese e reciclagem (*up-regulation* e *down-regulation*). Estas três características - especificidade, saturabilidade e alta afinidade - são a base para a caracterização dos receptores de angiotensina e ajudam a identificar componentes antagonistas para o desenvolvimento de drogas (Goodfriend e cols., 1996). Métodos quantitativos autoradiográficos são os de escolha no estudo

de caracterização, localização e regulação dos receptores cerebrais de Ang II (Saavedra e cols., 1993).

1.1.3. Tipos de Receptores :

Os dois tipos de receptores de Ang II conhecidos, denominados de AT₁ e AT₂, são polipeptídeos contendo aproximadamente 360 aminoácidos que atravessam a membrana celular sete vezes (Goodfriend e cols.,1996). A especificidade e a alta afinidade da ligação da Ang II aos receptores são determinadas por aminoácidos localizados na superfície extracelular da membrana ou perto desta, bem como pelas seqüências em domínios transmembrânicos. Apesar da similar afinidade para Ang II, os receptores AT₁ e AT₂ são diferentes em sua função e na sua origem genética, assemelhando-se em apenas 30% em suas seqüências homólogas (Goodfriend e cols.,1996; Timmermans e cols., 1995; Unger e cols., 1996 ; MacGregor e cols., 1995). Os resíduos de aminoácidos identificados em AT₁ como essenciais para a ligação da Ang II (Arginina¹⁶⁷, Lisina⁹, Triptofano²⁵³, Threonina²⁶⁰ e Ácido Aspártico²⁶³) são bem preservados no receptor AT₂ (Timmermans e cols., 1995).

1.1.4. Mecanismos de Transdução de Sinal dos Receptores:

O sinal de transdução do receptor AT₁ ocorre da mesma maneira que o mecanismo de transdução do sinal usado por muitos outros receptores acoplados à membrana. A ligação da Ang II ao receptor AT₁ leva à dissociação da ligação do

nucleotídeo guanina da proteína G. Esta dissociação leva à ativação da fosfolipase C para gerar o diacilglicerol e o trifosfato de inositol (IPT). O IPT libera o cálcio intracelular. A Ang II também aumenta a entrada de cálcio para a célula através dos canais da membrana. O cálcio e o diacilglicerol ativam enzimas, incluindo as quinases proteína C e cálcio-calmodulina que irão catalizar a fosforilação da proteína a qual regula a função da célula afetada pela Ang II. Toda esta cascata de eventos ocorre em segundos ou minutos (Fitzsimons, 1980; MacGregor e cols., 1995; Goodfriend e cols., 1996).

Por outro lado, o receptor AT_2 não apresenta propriedades que são específicas de outros receptores com sete domínios transmembrânicos, pois não promove a dissociação da proteína G e não envolve o fosfoinositol no seu mecanismo de ação. A estimulação do receptor pela Ang II não influencia o sistema de segundo mensageiro, mas pode diminuir ou aumentar os níveis de guanina monofosfato cíclico (GMPC) intracelular devido à modulação da proteína guanilil ciclase. O receptor AT_2 foi demonstrado estar acoplado à proteína fosfotirosina fosfatase levando à desfosforilação da tirosina e aumento da corrente iônica do canal retificador de potássio, inibindo a proteína G, ativando serina / treonina fosfatase 2A (PP2A), e, conseqüentemente, inibindo a atividade das proteinoquinases ativadas por mitógenos (MAP quinases) (Timmermans e cols., 1995; Ganong, 1995; Bottari e cols., 1993; Huang e cols., 1996). Pesquisas objetivando caracterizar receptores de Ang II em membrana fetal indicam que ambos os receptores AT_1 e AT_2 são intermediários da desfosforilação da tirosina em estágios iniciais de desenvolvimento (Ciuffo e cols., 1998). O exato mecanismo de ação do receptor AT_2 ainda precisa ser melhor esclarecido (Ganong, 1995; Huang e cols., 1996; Bedecs e cols., 1997; Shenoy e cols., 1999).

1.1.5. Abordagem Farmacológica e Molecular dos Receptores:

A nomenclatura dos receptores AT₁ e AT₂ é baseada na ligação seletiva de um ligando antagonista não-peptídico ou peptídico: a ligação da Ang II em receptores AT₁ é seletivamente antagonizada pelo ligando não-peptídico Du Pont 753 (Losartan); a ligação da Ang II em receptores AT₂ é seletivamente bloqueada pelos ligandos não-peptídicos PD 123177 e PD 123319 e pelo peptídeo CGP 42112A (Höhle e col., 1995; Gehlert e col., 1991; Timmermans e col., 1995; Bumpus e col., 1991). Ligações de Ang II que não são bloqueadas por nenhuma dessas classes de antagonistas é dita atípica, sendo que estes sítios podem ser designados em AT₃, AT₄,..., AT_n (Timmermans e col., 1995). Outro peptídeo antagonista da ligação da Ang II, chamado Saralasin, mostra-se não-seletivo e inibe os dois sítios de ligação (Timmermans e col., 1995; Barnes e col., 1993).

O número de receptores não ocupados na membrana celular depende das taxas pelos quais os receptores são biossintetizados ou inseridos dentro da membrana e das taxas de competição, de internalização e degradação. A internalização dos receptores de Ang II não é estimulada enquanto um antagonista está ligado; o processo requer um hormônio agonista ativo (Goodfriend e cols., 1996).

Tsutsumi & Saavedra (1992) demonstraram a existência da heterogenidade do receptor AT₁, onde, no encéfalo, sua ligação mostrava-se sensível à presença de nucleotídeos guanina, mas somente os receptores AT₁ do núcleo paraventricular, e não do órgão subfornical ou trato solitário, foram sensíveis ao pré-tratamento com toxina pertussis, indicando a possibilidade de diferentes subgrupos de receptores AT₁ associados com proteínas G, AT_{1A} e AT_{1B}. Estes subtipos do receptor AT₁ apresentam grande seqüência homóloga (>90%), mas divergem em sua seqüência de

bases não codificadas, sugerindo diferentes mecanismos de expressão genética, e têm sido clonados em roedores e no genoma humano, apesar de existirem controvérsias sobre a existência desses subtipos adicionais em humanos (Timmermans e cols., 1995). Por sua grande semelhança estrutural, os receptores AT₁A e AT₁B não apresentam distinção em suas afinidades com ligandos, o que dificulta a abordagem farmacológica desses estudos. A hipótese do receptor AT₁A ser o responsável por ações centrais da Ang II no prosencéfalo e o receptor AT₁B, o responsável pelas ações diretas do peptídeo na adeno-hipófise baseia-se na distribuição predominantemente diferenciada dos receptores nestes tecidos (Lenkei e cols., 1995).

A definição da função dos subtipos de receptor da Ang II com antagonistas pode ser acompanhada por bloqueio a respostas pela co-administração da Ang II com o antagonista específico ou pela administração das duas substâncias em separado, observando as mudanças resultantes (Timmermans e cols., 1995). O uso de um antagonista para definir a função do receptor de Ang II requer que o mesmo tenha alta especificidade para o receptor estudado *in vivo* e *in vitro* e que não possua atividade intrínseca ou agonista parcial. O antagonista não-peptídico Losartan, substância utilizada na clínica médica como um anti-hipertensivo (Chan e cols., 1999), tem sido o mais amplamente estudado por sua alta especificidade aos receptores AT₁ de Ang II. A maioria das pesquisas *in vitro* descreve o Losartan como um fármaco que não apresenta atividade intrínseca, porém existem dados sugerindo que o cálcio intracelular é liberado em resposta a altas concentrações do medicamento (Timmermans e cols., 1995). Dados recentes revelam que o Losartan inibe o comportamento sexual de ratos machos quando administrado de forma crônica por via oral (Chan e cols., 1999), como também promove um efeito ansiolítico em camundongos (Barnes e cols., 1990). Doses farmacológicas de

Losartan, administradas perifericamente, podem atravessar a barreira hematoencefálica em quantidade suficiente para bloquear o receptor AT_1 (Palmer e cols., 1994).

Estudos com os antagonistas não-peptídico PD 123319 e peptídico CGP 42112 sugerem que o PD 123319, além de sua atividade em AT_2 , apresenta alguma atividade intrínseca ao sítio AT_1 , e que o CGP 42112 apresenta significativa atividade intrínseca, quando ambos são administrados em altas concentrações (Timmermans e cols., 1995). A atividade agonista intrínseca do peptídeo CGP 42112 tem sido sugerida em estudos relacionados com o aumento da corrente de potássio nos neurônios hipotalâmicos. Este aumento de corrente é bloqueado com a administração do antagonista AT_2 , PD 123319, mas não com o antagonista AT_1 , Losartan, sendo este efeito vinculado ao receptor AT_2 . A ligação do receptor AT_2 com o peptídeo CGP 42112 produziu uma resposta similar a da Ang II (Martens e cols., 1996). Dados mais recentes também descrevem uma atividade agonista intrínseca do peptídeo CGP 42112 em estruturas envolvidas na resposta visual, que contém ambos subtipos de receptores, AT_1 e AT_2 , onde mostram uma supressão da atividade visual neuronal em injeções dose-dependentes de Ang II, bloqueio completo desse efeito na presença de Losartan e bloqueio parcial na presença de PD 123319 (Merabet e cols., 1997). Estudos relacionados com o aumento da atividade de específicas proteínas-quinases pela Ang II, atividade mediada pelo receptor AT_1 , utilizando culturas de neurônios, descrevem ser o peptídeo CGP 42112 um potente agonista do receptor AT_2 exacerbando o papel modulatório negativo do receptor sobre a atividade dessas proteínas (Huang e cols., 1996). Os mecanismos que podem advir das ligações dos ligandos com os receptores, a exata especificidade dos

ligandos usados e a possibilidade de outro subtipo de receptor implicado na ligação da Ang II ainda requer melhor investigação (Merabet e cols., 1997).

1.1.6. Distribuição dos Receptores:

A distribuição dos receptores da Ang II mostra que o subtipo AT₁ predomina, em termos de densidade, em muitos tecidos, embora a razão dos receptores AT₁/AT₂ varia significativamente entre as espécies e entre os tecidos de uma mesma espécie. O subtipo AT₂ predomina em tecidos fetais sendo que em ratos recém-nascidos e em ratos adultos o receptor AT₁ representa a maioria dos sítios de ligação (Timmermans e cols., 1995; Millan e cols., 1991). O número de receptores de Ang II aumenta muito com o crescimento, mostrando que o peptídeo apresenta um papel fisiológico importante durante todo o desenvolvimento orgânico (Barnes e cols., 1990; Millan e cols., 1991). O receptor AT₁ no cérebro mostra um moderado grau de conservação através das diferentes espécies de mamíferos, enquanto o receptor AT₂ é mais encontrado no SNC de humanos (MacGregor e cols., 1995).

As funções da Ang II estão relacionadas à localização de seus receptores sendo que, no cérebro, a distribuição dos receptores é bastante heterogênea (Barnes e cols., 1993). No cérebro de ratos jovens, o receptor AT₁ foi localizado em áreas do sistema límbico, em estruturas envolvidas na regulação cardiovascular e homeostase dos líquidos, em partes da formação hipocampal, no plexo coróide, na hipófise e em todas as áreas do cérebro relacionadas com o controle central da função hipofisária (Jöhren e cols., 1997; Jöhren e Saavedra, 1996). Os subtipos AT_{1A} tem distribuição predominante no encéfalo, enquanto o subtipo AT_{1B}, na hipófise (Lenkei e cols.,

1997). O receptor AT_2 mostrou-se concentrado em áreas envolvidas no controle e aprendizado da atividade motora, visual, sensorial como também em estruturas límbicas (Tsutsumi e Saavedra, 1991; Song e cols., 1992; Halbach e Albrecht, 1998; Timmermans e cols., 1995). A alta concentração de receptores AT_2 , descrita no encéfalo de ratos jovens, indicava um possível papel da Ang II no desenvolvimento de estruturas do SNC (Tsutsumi e Saavedra, 1991) e na regulação cerebral (Timmermans e cols., 1995). Hoje está bem definido que o receptor AT_2 tem ação na apoptose neuronal durante o desenvolvimento do SNC e, portanto, tem ação direta na plasticidade cerebral (Shenoy e cols., 1999).

1.1.7. Efeitos Biológicos da Angiotensina II :

A Ang II exerce efeitos periféricos e centrais. Seu efeito periférico mais importante é o desencadeamento de uma potente vasoconstrição nas arteríolas pré-capilares e, em menor grau, nas vênulas pós-capilares, promovendo o controle da pressão sanguínea (Zhuo e cols., 1998). Este peptídeo modula a liberação de catecolaminas, como também aumenta os níveis séricos de aldosterona pelo córtex da supra-renal (Ganong, 1995). A Ang II promove a síntese e liberação do hormônio antidiurético (ADH) por ação indireta do peptídeo periférico no SNC, mediada pelo subtipo AT_1A (Lenkei e cols., 1995), como também promove a síntese e liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) por ação direta na glândula hipofisária, mediada pelo subtipo AT_1B (Lenkei e cols., 1995). A Ang II periférica aumenta a absorção de líquidos no aparelho gastrointestinal e reduz ações mediadas por barorreceptores nas descargas simpáticas. Estes efeitos levam a um aumento da

concentração dos líquidos corporais com conseqüente elevação da pressão sanguínea (Fitzsimons, 1980; Lenkei e cols., 1997; Wu e cols., 1994). Os efeitos periféricos da Ang II são mediados pelo receptor AT_1 atuando no cérebro e nos demais tecidos. Células produtoras de aldosterona no córtex da glândula adrenal expressam principalmente AT_{1B} , enquanto células produtoras de catecolaminas na parte medular da glândula expressam o subtipo AT_{1A} (Lenkei e cols., 1995). A vasoconstrição periférica, desencadeando alterações sobre o sistema cardiovascular, também é um efeito central da Ang II cerebral demonstrado quando pequenas concentrações do peptídeo são administradas por via intracerebroventricular (icv) e por artérias intravertebrais (Fitzsimons, 1980). Este efeito é mediado pelo sistema nervoso simpático ativo devido à ação do hormônio endógeno no núcleo trato solitário (NTS) (Fitzsimons, 1998). Além de aumentar o tônus simpático, a Ang II cerebral causa um efeito dipsogênico e um aumento de apetite ao sal (Fitzsimons, 1998; Polidori e cols., 1995; Lenkei e cols., 1995) centralmente mediados por liberação de acetilcolina e catecolaminas (Fitzsimons, 1980; Fernandez & Dominguez, 1991). O aumento da Ang II periférica também causa efeito similar no comportamento de ingestão hídrica, assim como no aumento da pressão sanguínea, através dos OCVs, núcleo pré-óptico medial (APOM) e tecidos próximos ao terceiro ventrículo na lâmina terminal onde se encontram os neurônios que modulam a sede, o apetite ao sódio e o controle cardiovascular, e têm marcadas conexões com o hipotálamo, sistema límbico e medula espinhal. Estes efeitos agudos da Ang II cerebral, aumento do apetite ao sal e da sede, e o controle da pressão sanguínea, são também mediados pelo receptor AT_1 (Fitzsimons, 1998), mais especificamente pelo subtipo AT_{1A} (Lenkei e cols., 1995). Pesquisas realizadas com camundongos mutantes, que mostram ausência do gene que codifica o receptor AT_2 , descrevem

uma resposta diminuída desses indivíduos para o comportamento de ingestão hídrica após terem sido privados de água, assim como um significativo aumento vasopressor em resposta à administração de Ang II, sugerindo que o receptor AT_2 promove um efeito depressor e antagonico da ação pressora mediada pelo receptor AT_1 (Ichiki e cols., 1995).

A Ang II cerebral aumenta a liberação da vasopressina, efeito mediado pelo receptor AT_1 (McKinley e cols., 1996), e do hormônio liberador corticotrópico (CRH), pelo receptor AT_1A (Lenkei e cols., 1997), através da neuro-hipófise e do hipotálamo, respectivamente. A Ang II central também exerce um efeito neuromodulador sobre a secreção de prolactina na hipófise e no cérebro por mecanismos opostos: estimula a liberação de prolactina, mediada pelo subtipo AT_1B que predomina nos lactotrofos da adeno-hipófise, e, no cérebro, promove um controle inibitório sobre a liberação de prolactina quando estimula a síntese de dopamina, através do receptor AT_1A (Steele, 1992; Steger & Bartke, 1995, Moreau e cols., 1994; Dornelles & Franci, 1998). A expressão de RNAm do receptor AT_1A em células tirosina-hidroxilase positivas no núcleo arqueado do hipotálamo comprova que a Ang II central tem um efeito inibitório sobre a prolactina através de células dopaminérgicas existentes neste núcleo (Jöhren e cols., 1997). A Ang II cerebral exacerba a transmissão sináptica por facilitar a neurotransmissão noradrenérgica aumentando a liberação de noradrenalina pelos terminais nervosos simpáticos e inibindo sua recaptção, sendo esta ação neuromoduladora mediada pelo receptor AT_1 (Lu e cols., 1995).

A Ang II participa do processo cognitivo facilitando a aprendizagem e a memória por ativação de sistemas dopaminérgicos (Winnicka e cols., 1997) e com provável envolvimento do receptor AT_2 (Braszko e cols., 1997), promovendo,

também, o desenvolvimento e a maturação cerebral (Huckle & Earp, 1994; Lenkei e cols., 1997). A Ang II, com ação mediada pelo receptor AT₁, estimula as MAP quinases, que são alvos intracelulares dos fatores de crescimento, promovendo, assim, uma ação de proliferação tecidual, contrastando com o receptor AT₂ que inibe a atividade das MAP quinases promovendo uma ação antiproliferativa celular (Huang e cols., 1996). Estudos mais recentes demonstram que o receptor AT₂ pode contribuir para a mielinização mediada pelas células de Schwann e, assim, participar de respostas neuroregenerativas periféricas (Gallinat e cols., 1998). Com estes dois efeitos, a Ang II participa da modulação da diferenciação celular, regeneração e remodelagem de tecidos do SNC e periféricos (Fitzsimons, 1998; Martin e cols., 1992; Huckle & Earp, 1994; Wu e cols., 1994). Dados recentes sugerem que o peptídeo estimula a apoptose neuronal, através do receptor AT₂, pela inibição das MAP quinases e aumento da atividade da *c-jun*, levando à fosforilação e ativação de uma proteína supressora de tumor, p53, a qual modula uma cascata de processos enzimáticos que resulta em um balanço entre proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas (Shenoy e cols., 1999; Kakinuma e cols., 1997; Matsusaka & Ichikawa, 1997).

A Ang II induz analgesia, com também estimula a visão, o olfato e a audição (Wright & Harding, 1992; Saavedra, 1993), aumentando, assim, a sensibilidade para estímulos sensoriais do ambiente por liberação dopaminérgica (Winnicka e cols., 1998), aumenta a atividade locomotora e o estresse, por modulação do sistema nervoso simpático e de outros mecanismos neuroendócrinos; todos estes são efeitos mediados pelo receptor AT₁ (Kregel e cols., 1994; Mendelsohn e cols., 1993; Belcheva e cols., 1997). Na ausência dos receptores AT₂, camundongos mutantes exibem uma diminuição dos movimentos espontâneos e do comportamento de

explorar (Huang e cols., 1996), como também apresentam uma diminuição da ansiedade quando expostos ao estresse demonstrando que o receptor AT₂ regula algumas funções do SNC, incluindo os comportamentos acima citados (Ichiki e cols., 1995).

A Ang II altera o ciclo reprodutivo, via receptor AT₁B, aumentando a síntese do hormônio luteinizante (LH) por ação da Ang II endógena no hipotálamo, promovendo a secreção do hormônio liberador gonadotrópico (GnRH), e por ação direta da Ang II periférica sobre a adeno-hipófise ou através dos OCVs (Franci e cols., 1990; Palmer e cols., 1994; Wright & Harding, 1992; Dornelles & Franci, 1998). Por via icv, a Ang II inibe o comportamento sexual de ratos machos com experiência sexual prévia, ação mediada pelo receptor AT₁, suprimindo a motivação sexual e a função erétil, levando ao aumento da latência de cópula e do intervalo para reiniciar a monta, fatores que podem estar associados com a elevação da pressão sistólica e com o aumento da sede (Clark, 1989; Keaton & Clark, 1998).

Para exercer estas ações, além de outras, a Ang II pode agir como um neurotransmissor convencional ou como um agente parácrino, interferindo em rotas de outros neurotransmissores e / ou neuropeptídeos (catecolaminas, serotonina, peptídeo natriurético atrial, peptídeos opiódeos, ácido γ -aminobutírico, por exemplo) atuando como um modulador de atividade neuronal (Paul e cols., 1993; Wright & Harding, 1992).

1.2. Organização Neural do Comportamento Sexual :

A organização neural do comportamento sexual é formada por uma complexa rede no sistema nervoso. Cottingham & Pfaff (1996), demonstraram evidências neuroanatômicas para interconexões entre as regiões do encéfalo que respondiam aos esteróides e propuseram a existência de rotas neurais, dentro do sistema límbico, sensíveis a hormônios e coordenadas por circuitos corticais, com entradas visuais, olfatórias e quimiossensoriais que modulam vários comportamentos, assim como o sexual.

O sistema límbico é formado pelo complexo amigdalóide junto com a formação hipocampal, diencéfalo e mesencéfalo, e desempenha um papel-chave no comportamento sexual (Martin, 1998). Dentro desta rede, o complexo amigdalóide ocupa um papel importante no comportamento modulando as emoções e auxiliando na coordenação de respostas corporais a situações estressantes e ameaçadoras (Martin, 1998). Este grupo de núcleos, localizado abaixo da superfície cortical dos hemisférios cerebrais e adjacente ao núcleo putâmen e à cauda do núcleo caudado, está dividido, basicamente, em três estruturas: basolateral, medial e central. Destas, a porção medial da amígdala (AMe) é a que está envolvida na modulação do comportamento sexual de machos e fêmeas (Mascó e Carrer, 1990; Rasia-Filho e cols., 1991; Wood, 1997; Martin, 1998). Pesquisas prévias mostram que lesões na porção corticomédial da AMe afetam o comportamento copulatório, incluindo um significativo decréscimo na investigação das fêmeas pelos machos (McGregor e Herbert, 1992), como também sugerem que implantes intracerebrais de esteróides na AMe podem facilitar a atividade sexual em ratos machos castrados (Rasia-Filho e cols., 1991).

O comportamento sexual, além de outros fatores, é dependente das interações de estímulos sensoriais do ambiente e estímulos de hormônios esteróides no cérebro. Estas interações requerem unidades de entrada e saída no sistema límbico para que possam expressar uma resposta comportamental (Kelly & Jessel, 1997). O bulbo olfatório (BO) representa uma unidade de entrada que recebe informações dos quimiossensores da mucosa olfatória ou do órgão vomeronasal. A APOM representa uma forma de unidade de saída, sendo esta o "centro" organizacional mais elevado para a expressão do comportamento sexual nos machos (Wood & Newman, 1995; Wood, 1997). A AMe é uma unidade intermediária que transmite entradas dos quimiossensores do BO para a APOM. Cada unidade é um componente importante para a atividade sexual, sendo que a destruição tanto do BO, quanto da AMe, da APOM ou das fibras que interconectam essas estruturas, pode abolir o comportamento sexual de modo imediato e permanente. Isto implica que a representação do comportamento sexual não está relacionado somente com uma região do cérebro, mas a uma rota neuronal que integra várias estruturas (Wood & Newman, 1995; Wood, 1997).

O comportamento sexual é composto de uma variedade de comportamentos, tais como a investigação anogenital, intromissão peniana e ejaculação, que são expressados em uma seqüência característica (ver adiante nesta introdução a revisão sobre o comportamento sexual). A AMe e a APOM contribuem para os comportamentos de investigação e copulatório (Sachs e Meissel, 1988). Entretanto, evidências sugerem que a AMe é o sítio primário para o comportamento de investigação, enquanto que a APOM assume uma importância central nos aspectos motores do comportamento sexual (Kondo e cols., 1995). Para o comportamento de investigação, a AMe recebe conexão direta da base do núcleo da estria terminal

(BNST), que também se interconecta com a APOM, sendo este núcleo intermediário das conexões entre o BO e a AMe (Li e cols., 1993). Outra estrutura que participa do comportamento sexual e tem conexão direta com a AMe, é a subdivisão magnocelular do núcleo pré-óptico medial (NPMmag) que recebe conexões via córtex frontal para vários núcleos do sistema cerebral envolvidos no aspecto motor do comportamento sexual (Wood & Newman, 1995; Wood, 1997). Existe a hipótese de que estas conexões estejam integradas com transmissões quimiossensoriais e transduções de estímulos hormonais (Wood, 1997).

Considerando que vários fatores podem causar diferentes conseqüências nos mecanismos que levam a um desempenho sexual nos machos, o estudo do comportamento sexual é bastante conveniente porque tanto sua facilitação quanto sua inibição podem ser quantificadas e assim serem pesquisados os efeitos de muitas substâncias (Bevan, 1989). A Ang II é uma das substâncias que podem interferir na atividade sexual.

1.2.1. Comportamento Sexual de Ratos:

O comportamento sexual é uma conseqüência da plasticidade do desenvolvimento do cérebro e representa a expressão da função reprodutiva de um organismo (Harlan e cols., 1980). No estudo dos mamíferos, o comportamento sexual de roedores tem sido o mais investigado (Sachs & Meisel, 1988). O comportamento sexual de ratos machos albinos foi descrito pela primeira vez por Stone (1922), e Beach & Stone (1940) organizaram um modelo experimental para o estudo do comportamento sexual em ratos (Hillegaart, 1991).

Considerando que estes animais apresentam hábitos noturnos, sua seqüência comportamental inicia, preferencialmente, durante o período escuro do dia (Davidson, 1966; Harlan e cols., 1980). O contato, num mesmo ambiente, de uma fêmea e um macho, pode dar início a um comportamento *pré-copulatório* (Davidson, 1966) que dura alguns segundos. A investigação social do casal é baseada em fatores sensoriais, como informações olfatórias (Meisel e cols., 1980) e vocalizações ultrasônicas (Bean e cols., 1981 ; Mo e cols., 1992; Johnston, 1985), e inicia com o macho explorando a região ano-genital da fêmea. O macho também pode lambe a fêmea, executar leves mordidas em sua cabeça e tronco (Davidson, 1966), mover-se sobre ela ou, também, "marcá-la", urinando sobre seu dorso (Sachs & Meisel, 1988). Uma fêmea receptiva, em estro, pode responder ao comportamento com breves corridas em direção oposta ao macho, saltos e paradas rápidas, sempre se posicionando com os quadrantes posteriores voltados para o macho (Karpas e cols., 1983) na tentativa de promover uma maior investigação dele em relação a ela. O macho, então, a persegue, lambe e cheira sua genitália, e tenta montá-la.

A ocorrência do comportamento sexual envolve três atividades básicas: a monta, a intromissão e a ejaculação (Hillegaart, 1991). O macho coloca-se por detrás da fêmea e a segura pelos flancos (região retrolombar) com seus membros anteriores. Tal atividade do macho é denominada de *monta*. A fêmea, por sua vez, responde em maior ou menor grau, exacerbando a lordose lombar, permitindo a penetração vaginal (Beach, 1967; Sachs & Meisel, 1988). Na seqüência, o macho realiza movimentos pélvicos por poucos segundos pressupondo-se a penetração peniana na vagina. Este comportamento é chamado de *intromissão* (Davidson, 1966). Após ele desfaz a monta e, geralmente, realiza a auto-limpeza de seus genitais (Sachs & Barfield, 1970) ou do restante do corpo e continua a explorar o ambiente antes da

próxima monta ou intromissão. Logo após a intromissão, ocorre uma redução temporária da excitação sexual antes que outro ato copulatório ocorra (Sachs & Barfield, 1970). Tipicamente o macho faz a intromissão vaginal em 50 a 80 % de suas montas (Bitran & Hull, 1987). Um número de montas, com ou sem intromissão peniana, ocorre antes da *ejaculação*, que sob o ponto de vista comportamental, caracteriza-se por uma intromissão mais profunda e demorada que se acompanha da abdução das patas dianteiras do macho por alguns segundos onde ele poderá permanecer imóvel sobre a fêmea. Usualmente seis a doze intromissões precedem uma ejaculação. Após a ejaculação, segue-se um período onde o rato não tem atividade copulatória por cerca de quatro a oito minutos, denominado *intervalo pós-ejaculatório* ou *período refratário* (Davidson, 1966; Harlan, 1980; Schnur, 1989; Sachs & Meisel, 1988; Bitran & Hull, 1987; Hillegart, 1991; Lucion e cols., 1993). Neste intervalo o macho não é influenciado por nenhum estímulo sexual (Davidson, 1966) e o momento é caracterizado por sonolência e vocalizações ultrasônicas (Mo e cols., 1992).

Beach (1956) sugeriu que a iniciação e a consumação do comportamento sexual dos machos eram controlados por dois processos de motivação independentes: o primeiro chamado de "mecanismo de despertar sexual", em que o macho procura a fêmea para executar a monta, e o segundo, "mecanismo de intromissão e ejaculação", no qual ocorre a intromissão peniana que culmina em ejaculação (Mendelson & Pfau, 1989). Para a ocorrência desses dois processos de motivação do macho, o comportamento da fêmea é de grande importância (Matuszczyk & Larsson, 1993; Taylor e cols., 1987). É necessário que a fêmea esteja sexualmente receptiva para aceitar o macho na sua atividade reprodutiva. Para tal situação, torna-se indiferente usar fêmeas em estro natural ou ratas ovariectomizadas induzidas ao estro por

injeção seqüencial de estrógeno e progesterona (Mendelson & Pfaus, 1989; Landau & Madden, 1983; Mas e cols., 1987). A mera presença de uma fêmea sexualmente receptiva induz a modificações comportamentais, fisiológicas e endócrinas em um macho (Taylor e cols., 1987), desencadeando o processo de motivação sexual ou libido até atingir o ato copulatório propriamente dito (Mendelson & Pfaus, 1989). Entende-se por *libido* como o interesse sexual e a *potência* como o processo erétil necessário para o modelo copulatório (Bitran & Hull, 1987).

As medidas normalmente feitas para a análise do comportamento sexual são: latência e freqüência de cheirar genitais, de perseguição, de monta, de intromissão e de ejaculação, e o intervalo pós-ejaculatório (Hillegart, 1991). A medida mais comum do comportamento pré-copulatório, ou seja a libido ou o interesse sexual, é a latência da monta definida como o tempo decorrido desde o contato inicial do casal até a primeira monta, com ou sem intromissão (Wee & Clemens, 1989), ou a latência de intromissão, que é o tempo decorrido desde a introdução da fêmea até a primeira inserção peniana (Bitran & Hull, 1987). A medida da atividade da monta e da intromissão pode ser feita através da contagem do número de ocorrências num determinado intervalo, o que seria a freqüência propriamente dita de tais atividades. A medida da atividade copulatória, ou seja, a potência ou o processo erétil, envolve a latência para a primeira intromissão e ejaculação, a freqüência da monta e intromissão durante um determinado tempo e o período de inatividade sexual após a ejaculação (Sachs & Meisel, 1988). A medida comportamental da ejaculação inclui o número de intromissões que precedem este comportamento e sua latência, sendo esta o intervalo de tempo entre a primeira intromissão até a primeira ejaculação (Bitran & Hull, 1987).

Para avaliar de maneira adequada o comportamento sexual, deve-se estabelecer a relação entre o tempo de registro do comportamento e as atividades que serão observadas. Dois tipos de registro podem ser feitos: os que limitam a duração da sessão de observação pela ocorrência de uma seqüência comportamental e os que limitam a observação por um tempo pré-determinado. O primeiro método pode ser utilizado quando o objetivo é estudar a ocorrência de ejaculação e seu período refratário subsequente, onde registros de trinta minutos são os mais adequados já que o macho, normalmente, ejacula cerca de dez a vinte minutos após o contato inicial com a fêmea e o período pós-ejaculatório é de no máximo oito minutos. O segundo método é utilizado quando o objetivo é estudar somente a frequência das intromissões. Neste, o tempo de observação pode ser bem menor, como dez minutos. Assim, a limitação do experimento pode ser feita pelo tempo e pelo comportamento demonstrado pelo macho (Rasia-Filho e cols., 1992).

HIPÓTESE / OBJETIVO

2. HIPÓTESE

O SRA cerebral é crítico para a regulação do equilíbrio hidro-eletrolítico e vegetativo. Além disso, pesquisas mais recentes sugerem que a Ang II, atuando no SNC, desempenharia um papel modulador de comportamentos, inclusive do comportamento sexual. Baseado nas evidências citadas na introdução de que :

- a Ang II tem ação no SNC modulando diversos comportamentos,
- o SNC produz Ang II e possui os dois tipos de receptores caracterizados,
- o núcleo da AMe é um sítio envolvido na produção do comportamento sexual e possui receptores para Ang II,

construiu-se a hipótese de que a Ang II é um componente importante na modulação do comportamento sexual por sua ação direta no núcleo da AMe, podendo esta ação ser devida à interação do peptídeo aos receptores AT₁, AT₂ ou ambos. Para testar esta hipótese, investigou-se o efeito de microinjeções de Ang II e seus competidores na AMe sobre o comportamento sexual de ratos machos. Sua comprovação contribui para o entendimento de algumas alterações na função sexual associada com a hipertensão e acrescenta mais um componente da ação da Ang II no SNC na complexa participação deste peptídeo na modulação de funções vitais, permitindo avanços no entendimento da base neural de organização do comportamento sexual de ratos.

3. OBJETIVO

Testar o efeito de microinjeções de Ang II e seus competidores no núcleo da AMe sobre o comportamento sexual de ratos machos.

MATERIAL E MÉTODO

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Animais

Foram utilizados 112 ratos machos da variedade Wistar, com cerca de três meses de idade, peso corporal entre 300-350g, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (UFRGS).

Os ratos foram colocados em caixas de ambientação com 20 x 50cm , com fêmeas (duas/macho) também da variedade Wistar, com idade de dois meses, peso corporal entre 250-280g, provenientes do mesmo biotério. Os ratos foram mantidos com as fêmeas durante quinze dias. Após este período, as fêmeas foram retiradas das caixas e os ratos permaneceram sozinhos por mais sete dias. Passado o período de três semanas, estes ratos foram testados em seu desempenho sexual.

O teste do desempenho sexual consistiu em avaliar durante dez minutos o comportamento do macho perante uma fêmea. As fêmeas utilizadas para este teste apresentavam as mesmas características das anteriores quanto à variedade, peso e idade, sendo que as utilizadas neste momento foram submetidas à retirada dos ovários, e dez dias após a ovariectomia foram induzidas à receptividade sexual por injeções intramusculares de benzoato de estradiol (benzo-ginoestril ap® 5mg - SARSA, RJ) na dose de 2 µg/rata, 48 horas antes do teste, e progesterona-butilacetato de estradiol (ginecoside® 53mg - Darrow, RJ) na dose de 500 µg/rata, 6 horas antes do teste (Mas e col., 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 à cirurgia estereotáxica.

A metodologia cirúrgica consistiu da canulação estereotáxica bilateral da AMe. Para a localização precisa deste núcleo, foi utilizado o atlas de cérebro de ratos (Paxinos & Watson, 1986) onde foram retiradas as medidas para o acesso cirúrgico.

As coordenadas utilizadas foram:

- antero- posterior: 2,7 mm
- lateral: 3,5 mm
- vertical: 6,5 mm

Todas as medidas foram consideradas a partir da linha do bregma como ponto zero. A medida da coordenada vertical foi considerada a partir das membranas meníngeas. A cânula, verticalmente colocada, ficava dois milímetros acima do núcleo da AMe, e o acesso ao interior deste núcleo era realizado por uma agulha injetora que atingia a medida vertical de 8,5 mm no cérebro.

Os animais foram anestesiados por via intramuscular com Xilazina (Ronpum® 100mg/ml - Profarb, MG) e Cloridrato de Ketamina (Ketalar® 50mg/ml - Parke-Davis, SP) na dose de 50mg/kg e de 100 mg/kg de peso corporal, respectivamente.

As cânulas foram introduzidas com o auxílio do aparelho estereotáxico de David Kopf, onde a cabeça, colocada em posição reta no aparelho, e a mandíbula do animal eram fixadas de maneira firme, com pinos colocados em seu conduto auditivo externo e uma presa em seus dentes incisivos.

Após anestesiados e fixados no estereotáxico, os ratos foram submetidos a uma incisão longitudinal na pele, na linha média da região superior do crânio, expondo o periósteo, onde foi realizada a técnica de trepanação, utilizando-se uma broca, com largura adequada para a passagem das cânulas de maneira perpendicular ao cérebro. Todas as cânulas tinham comprimento de 13 mm e diâmetro externo de

0,6 mm. Depois de realizada a introdução das cânulas, seguindo as coordenadas acima citadas, essas foram fixadas com polímero sintético (acrílico) e com o auxílio de um pequeno parafuso acoplado ao tecido ósseo. Terminado este procedimento, os animais foram retirados do estereotáxico e aquecidos com uma lâmpada de 60 watts, incandescente, para uma melhor recuperação anestésica que durava de 2 a 4 horas. Os ratos eram identificados por uma numeração escrita no acrílico. Iniciados os primeiros movimentos, os ratos eram devolvidos a sua caixa de origem, tendo-se o cuidado de deixar, no máximo, dois ratos por caixa.

Contados seis dias de canulação, os animais foram injetados com diferentes doses de Angiotensina II humana (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) (Bachem - Califórnia), dose isolada de Losartan (*{2-n-butil-4-cloro-5-hidroxi metil-1- [2'-(1H-tetrazole-5-il bifenil-4-il) metil] imidazole}*) conhecido como Du Pont 753, Merck - EUA) e de CGP 42112A (*[nicotil-Tir- (N^α benzilcarbonil-Arg) Lis-His Pro-Ile-OH]* Sigma - Califórnia), e coinjeções de Ang II 50pg com Losartan 10ng e Ang II 50pg com CGP 42112 1ng. As injeções foram realizadas com o auxílio de uma agulha injetora com 15 mm de comprimento.

Os ratos foram divididos em três experimentos:

- 1 grupo para solução salina (n = 15) - controle (comum aos três experimentos).

Experimento 1 :

- 5 grupos com diferentes doses de Ang II (curva dose-efeito):
 - Ang II 10pg (n = 10)
 - Ang II 25pg (n = 10)
 - Ang II 50pg (n = 15)
 - Ang II 100pg (n = 10)
 - Ang II 150pg (n = 12)

Experimento 2 :

- 1 grupo para Losartan na dose de 10ng (n = 10);
- 1 grupo de coinjeção para Ang II 50pg com Losartan 10ng (n=10).

Experimento 3 :

- 1 grupo para CGP 42112 na dose de 1ng (n=10);
- 1 grupo de coinjeção para Ang II 50pg com CGP 42112 1ng (n=10).

4.2. Ambiente experimental

Os ratos foram mantidos em caixas de ambientação durante as três semanas em que permaneceram com ou sem as fêmeas (os ratos permaneceram duas semanas com as fêmeas adquirindo experiência sexual, e uma semana sem as fêmeas em abstinência sexual).

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

Todos os animais foram mantidos sob um ciclo claro-escuro de 12:12 horas com início da fase escura às 14:30 horas. A temperatura foi mantida constante em torno de 22-24°C. Os animais tinham livre acesso à água e comida durante todo o

experimento, menos na fase de registro do comportamento. A sala era mantida com sonoridade controlada.

4.3. Registro comportamental

Em todo o experimento, o registro foi realizado de uma a seis horas após início da fase escura. Inicialmente o macho era retirado da caixa onde estava ambientado e logo a seguir era administrado, por via intracerebral, a substância a ser testada para aquele dia, sempre respeitando a ordem de injeção: primeiro na cânula direita e a seguir na esquerda. Após este procedimento, o animal era colocado na caixa de observação por um período de quinze minutos para adaptação ao novo ambiente. Passado este intervalo, a fêmea ovariectomizada e induzida à receptividade sexual com estrógeno e progesterona era colocada na caixa junto ao macho, iniciando-se, imediatamente a seguir, a sessão de registro do comportamento que durava dez minutos para os comportamentos de caminhar, de cheirar genitais, de monta e de intromissão; e trinta minutos para o comportamento de ejaculação e para o intervalo pós-ejaculatório (período refratário). O registro consistiu em filmar os animais com uma filmadora de vídeo. Ao término do registro, este era visualizado com o auxílio de um aparelho de vídeo por um observador treinado que digitava, num computador tipo PC, alimentado com programa especialmente elaborado, uma tecla selecionada para cada comportamento a medida que ocorria. O programa computava a frequência, a latência e a duração de cada comportamento. A frequência era o número de vezes que cada comportamento ocorria durante o registro. A latência era o tempo em segundos transcorridos desde o início da sessão até a primeira vez

que o comportamento ocorria. A duração foi caracterizada como o tempo total de ocorrência de um comportamento específico. Se o comportamento não era observado durante o registro (frequência igual a zero), computava-se latência de 600 segundos, correspondentes ao tempo de dez minutos, ou 1800 segundos, correspondentes ao tempo de trinta minutos, para fins de análise estatística. Portanto, a frequência, a latência e a duração foram os itens comportamentais registrados e analisados.

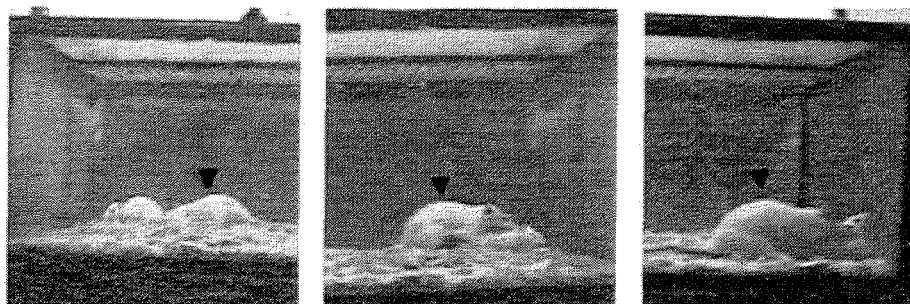
Em cada animal era injetada solução salina ou as substância a serem testadas sempre em um volume total de 0,3 µl/cânula. As injeções eram feitas quinze minutos antes do início do registro com o auxílio de uma seringa de Hamilton de 10µl, onde em sua extremidade era acoplado um tubo de polietileno de 30cm e uma agulha de anestesia odontológica descartável - 30G (agulha injetora) de 15mm de comprimento. Esta agulha injetora era primeiro introduzida na cânula direita, tendo o cuidado de mantê-la dentro da cânula fixada no periósteo por um minuto após ter sido injetada a solução, sendo o mesmo procedimento realizado no lado esquerdo.

Os parâmetros comportamentais registrados foram os seguintes:

- Locomoção: o macho persegue a fêmea ou explora a caixa.
- Exploração dos genitais: o macho lambe ou cheira os genitais da fêmea.
- Monta: o macho coloca suas patas dianteiras sobre a fêmea sem movimentos pélvicos.
- Intromissão peniana: o macho coloca suas patas dianteiras sobre a fêmea fazendo sucessivos movimentos pélvicos de aproximação dos flancos. Logo após a intromissão peniana, o macho, geralmente, realiza a limpeza dos genitais.

- Ejaculação: após sucessivas intromissões, o macho fica alguns segundos em posição de congelamento, precedida de um movimento de abdução dos membros anteriores.
- Intervalo pós-ejaculatório (ou período refratário): após a ejaculação o macho fica sexualmente inativo até que ocorra uma nova monta ou intromissão.

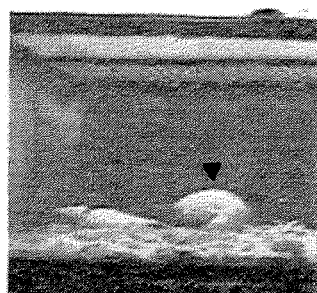
FIGURA I - Parâmetros comportamentais



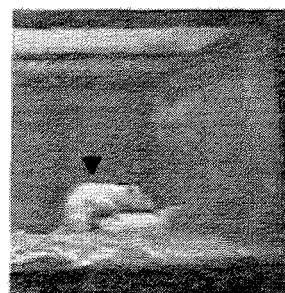
**Exploração
dos
Genitais**

Monta

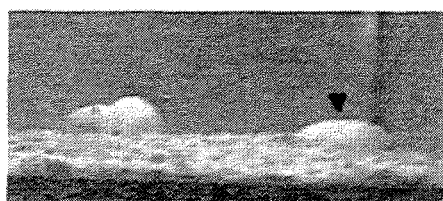
Intromissão



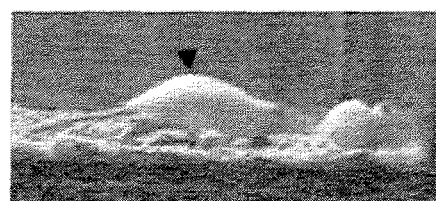
**Limpeza dos
Genitais**



Ejaculação



**Período
Refratário**



Locomoção

Figura I - Parâmetros comportamentais obtidos da filmagem em vídeo de um casal de ratos durante o registro comportamental. O símbolo ▼ refere-se ao macho.

4.4. Verificação da localização das cânulas

Após o término dos registros, os ratos eram submetidos à perfusão encefálica para a realização dos cortes histológicos. Para isto, os animais receberam dose letal (50 mg/rato) de Tiopental sódico (Thionembatal - Abbott, RJ) por via intraperitoneal e, ainda na presença de batimentos cardíacos, havia a abertura torácica, expondo o coração, clampeamento da aorta descendente e injeção de 40ml de NaCl 0,9% e, imediatamente após, 20 ml de formol 10% via ventrículo esquerdo. No final deste procedimento, houve retirada dos encéfalos, sendo estes submersos em formol 10% por duas semanas. Passado este período, os encéfalos foram cortados em vibrátomo a uma espessura de 100 μ m, os cortes foram colocados sobre uma lâmina gelatinizada e, então, corados com cresil-violeta.

A verificação histológica do trajeto ao núcleo da AMe foi realizada com o auxílio do atlas de cérebro de ratos (Paxinos e Watson, 1986) e um microscópio óptico. Todos os ratos em que houve confirmação histológica do devido acesso ao núcleo-alvo, foram separados para efetivação do experimento, os demais não foram utilizados.

FIGURA II - Esquema em corte coronal de encéfalo de rato

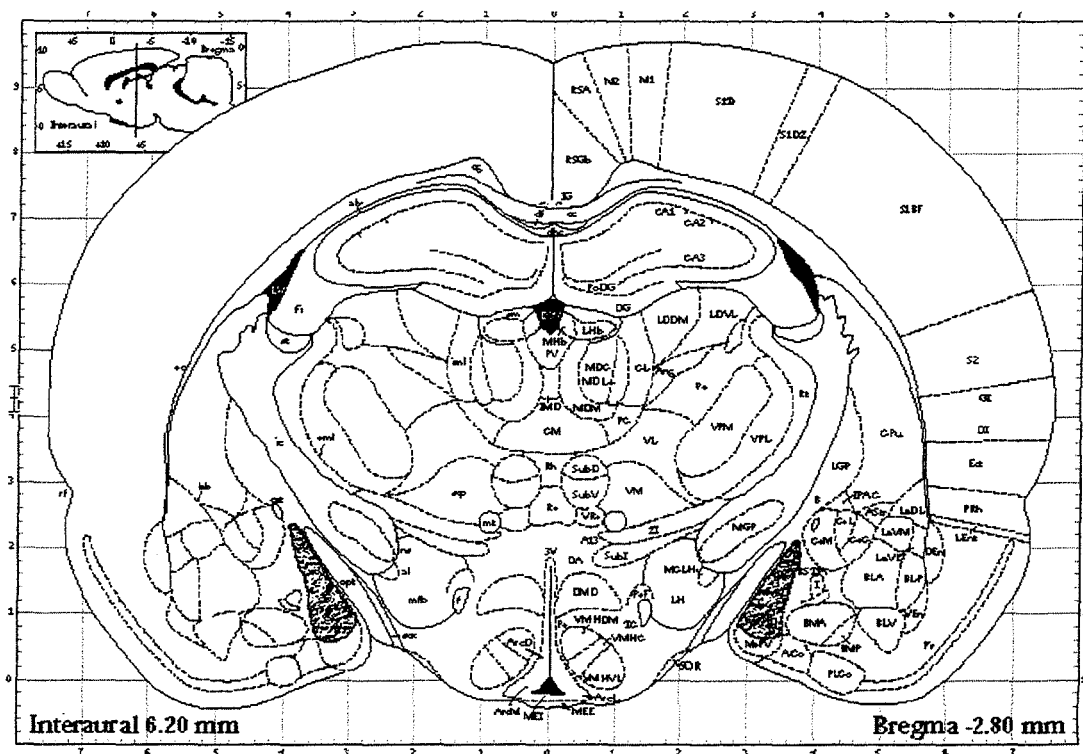


Figura II - Esquema em corte coronal de encéfalo obtido do atlas de cérebro de ratos, Paxinos e Watson (1986). As áreas onde foram realizadas as microinjeções de Ang II, Losartan, CGP 42112, Ang II com Los e Ang II com CGP 42112, na AME, estão assinaladas em azul.

4.5. Protocolo experimental

DIAS	EVENTOS
1°	Padronização da idade dos machos (dois meses). Machos e fêmeas (duas/macho) são colocados em caixas de ambientação.
1°-15°	Machos são mantidos com fêmeas.
15°	Fêmeas selecionadas são ovariectomizadas. Fêmeas, que permaneciam com machos, são retiradas das caixas. Machos são acondicionados em três animais/caixa.
16°-22°	Machos ficam sem contato com fêmeas.
23°	Machos são avaliados pelo seu desempenho sexual. Fêmeas ovariectomizadas e induzidas à receptividade sexual são utilizadas para o teste.
24°	Ratos considerados sexualmente ativos são submetidos à cirurgia estereotáxica.
30°	Realização das injeções na AMe das substâncias a serem testadas e registro do comportamento dos machos. Fêmeas ovariectomizadas e induzidas à receptividade sexual são utilizadas para o registro.
31°	Machos são perfundidos para a retirada dos encéfalos que são acondicionados em solução de formol 10%.
45°	Realização de cortes dos encéfalos em vibrátomo para a localização do trajeto das cânulas.

4.6. Expressão dos resultados

Os resultados estão expressos numericamente em frequência, latência e duração dos comportamentos.

Os valores relativos à frequência estão expressos como a média (\pm EPM) do número de vezes que cada comportamento ocorre em um intervalo de 10 minutos (600s).

Os valores relativos à latência dos comportamentos estão expressos em segundos como mediana e intervalo interquartil do período desde o início do registro até a primeira ocorrência do comportamento específico .

Os valores relativos à duração estão expressos em segundos como a média (\pm EPM) do somatório das durações individuais de cada ocorrência de um determinado comportamento em um intervalo de 10 minutos (600s).

Os valores relativos à duração do período refratário (intervalo pós-ejaculatório) estão expressos como a média (\pm EPM) da duração do intervalo entre o comportamento de ejaculação e a monta subsequente, ocorrido em um intervalo de no máximo 10 minutos (600s).

Os valores relativos à latência de ejaculação estão expressos em segundos como mediana e intervalo interquartil do período desde o início do registro até a ejaculação ocorrida em um intervalo máximo de 30 minutos (1800s).

4.7. Análise estatística

Os itens comportamentais: frequência, latência e duração foram analisados através do teste da ANOVA de uma via comparando-se as médias através do teste de Newman-Keuls para frequência e duração, e as medianas através do teste de Kruskal-Wallis para a latência, nas comparações entre os grupos. Na análise, a diferença estatisticamente significativa considerada é com $p < 0,05$.

RESULTADOS

5. Resultados

Os resultados obtidos nos testes comportamentais com ratos submetidos a microinjeções na AMe com diferentes doses de Ang II, dose de 10ng de Losartan, antagonista do receptor AT₁, e dose de 1ng de CGP 42112, antagonista do receptor AT₂, assim como a doses coinjetadas de Ang II 50pg com Losartan 10ng e Ang II 50pg com CGP 42112 1ng, comparados entre os grupos e com solução salina (grupo controle), são os seguintes:

Frequência de Intromissão - FIGURA III :

O gráfico 1 mostra uma diminuição significativa da frequência de intromissão nas doses de Ang II: 25pg, 50pg, 100pg e 150pg quando comparadas ao grupo controle.

O gráfico 2 mostra uma diminuição significativa da frequência de intromissão na dose de Ang II 50pg, e uma reversão deste efeito na coinjeção de Ang II 50pg com Los 10ng, quando as doses são comparadas ao grupo controle. O mesmo gráfico mostra que a dose isolada de Losartan 10ng não apresenta diferença significativa quando comparada ao grupo controle. Portanto, o Losartan reverte o efeito inibitório promovido pela Ang II, demonstrando não ter efeito próprio, na dose de 10ng, para este item comportamental.

O gráfico 3 mostra uma diminuição significativa da frequência de intromissão na dose de Ang II 50pg, e uma reversão deste efeito na coinjeção de Ang II 50pg com CGP 42112 1ng, quando as doses são comparadas ao grupo controle. O mesmo

gráfico também mostra que a dose isolada de CGP 42112 1ng não apresenta diferença significativa quando comparada ao grupo controle. Isto indica que o CGP 42112 não tem efeito próprio sobre a frequência de intromissão, como também reverte o efeito inibitório da Ang II quando coinjectado com o peptídeo.

Frequência de Monta - FIGURA IV :

Os gráficos 1,2 e 3 não mostram diferença significativa da frequência de monta para as doses injetadas quando comparadas ao grupo controle.

Frequência de Exploração dos Genitais - FIGURA V :

Os gráficos 1,2 e 3 não mostram diferença significativa da frequência de exploração dos genitais para as doses injetadas quando comparadas ao grupo controle.

Frequência de Locomoção - FIGURA VI :

O gráfico 1 mostra uma diminuição significativa da frequência de locomoção somente nas doses de Ang II: 100pg e 150pg quando comparadas ao grupo controle.

Os gráficos 2 e 3 não mostram diferença significativa da frequência de locomoção para as demais doses injetadas quando comparadas ao grupo controle.

A Ang II promove uma diminuição na locomoção somente em altas doses. Seus competidores, Losartan e CGP 42112, não exercem influência sobre a locomoção nas doses estudadas.

Duração de Locomoção - FIGURA VII :

O gráfico 1 mostra um aumento significativo da duração de locomoção na dose de Ang II 10pg quando comparada ao grupo controle. Portanto, a Ang II exacerba a locomoção quando injetada centralmente em menores quantidades.

Os gráficos 2 e 3 não mostram diferença significativa da duração de locomoção para as demais doses injetadas quando comparadas ao grupo controle.

Duração do Intervalo Pós-ejaculatório - FIGURA VIII :

O gráfico 1 mostra um aumento significativo da duração do intervalo pós-ejaculatório nas doses de Ang II: 25pg, 50pg, 100pg e 150pg quando comparadas ao grupo controle.

O gráfico 2 mostra um aumento significativo da duração do intervalo pós-ejaculatório na dose de Ang II 50pg, assim como na dose isolada de Losartan 10ng e na coinjeção de Ang II 50pg com Los 10ng, quando as doses são comparadas ao grupo controle. A Ang II 50pg e o Losartan 10ng apresentam efeitos similares neste item comportamental.

O gráfico 3 mostra um aumento significativo da duração do intervalo pós-ejaculatório na dose de Ang II 50pg quando comparada ao grupo controle. A coinjeção de Ang II 50pg com CGP 42112 1ng reverte o efeito promovido pela dose de Ang II 50pg. O mesmo gráfico mostra que a dose isolada de CGP 42112 1ng não apresenta diferença significativa quando comparada ao grupo controle.

Latência dos diferentes parâmetros comportamentais: TABELAS I, II, III:

➤ *Latência de Monta*

A tabela I mostra um aumento significativo da latência de monta na dose de Ang II 50pg quando comparada ao grupo controle.

A tabela II mostra um aumento da latência de monta na dose de Ang II 50pg, e uma reversão deste efeito na coinjeção de Ang II 50pg com Los 10ng quando as doses são comparadas ao grupo controle. A mesma tabela mostra que a dose isolada do Losartan 10ng não apresenta diferença significativa quando comparada ao grupo controle. Isto demonstra que o Losartan reverte o efeito inibitório da Ang II sobre a latência de monta, não apresentando efeito próprio sobre este comportamento na dose de 10ng.

A tabela III mostra um aumento da latência de monta na dose de Ang II 50pg, e uma reversão deste efeito na coinjeção de Ang II 50pg com CGP 42112 1ng, quando as doses são comparadas ao grupo controle. A mesma tabela mostra que a dose isolada de CGP 42112 1ng não apresenta diferença significativa quando

comparada ao grupo controle. Portanto, CGP 42112 1ng reverte o aumento da latência de monta promovido pela Ang II, não apresentando efeito próprio sobre este comportamento.

➤ *Latência de Intromissão*

A tabela I mostra um aumento significativo da latência de intromissão nas doses de Ang II: 50pg, 100pg e 150pg quando comparadas ao grupo controle.

A tabela II mostra um aumento significativo da latência de intromissão na dose de Ang II 50pg, e uma reversão deste efeito na coinjeção de Ang II 50pg com Los 10ng, quando as doses são comparadas ao grupo controle. A mesma tabela também mostra que a dose isolada de Losartan 10ng não apresenta diferença significativa quando comparada ao grupo controle. Portanto, o Losartan reverte o efeito inibitório promovido pela Ang II, como também não apresenta efeito próprio para a latência de intromissão na dose de 10ng.

A tabela III mostra um aumento significativo da latência de intromissão na dose de Ang II 50pg, e uma reversão deste efeito na coinjeção de Ang II 50pg com CGP 42112 1ng, quando as doses são comparadas ao grupo controle. Esta tabela também mostra que a dose isolada de CGP 42112 1ng não apresenta diferença significativa quando comparada ao grupo controle, demonstrando que o CGP 42112 1ng não apresenta efeito intrínseco para este item comportamental, como também reverte o efeito inibitório promovido pela Ang II quando coinjetado com o peptídeo.

➤ *Latência de Exploração dos Genitais*

A tabela I mostra um aumento significativo da latência de exploração dos genitais na dose de Ang II 50pg.

A tabela II mostra um aumento significativo da latência de exploração dos genitais na dose de Ang II 50pg, e uma reversão deste efeito na coinjeção de Ang II 50pg com Los 10ng, quando as doses são comparadas com o grupo controle. A mesma tabela também mostra que a dose isolada de Losartan 10ng não apresenta diferença significativa quando comparada ao grupo controle. Losartan reverte o aumento da latência de exploração dos genitais, evidenciado pela injeção de Ang II, sem apresentar efeito intrínseco sobre este item comportamental.

A tabela III mostra um aumento significativo da latência de exploração dos genitais na dose de Ang II 50pg, e uma reversão deste efeito na coinjeção de Ang II 50pg com CGP 42112 1ng, quando as doses são comparadas com o grupo controle. A mesma tabela também mostra que a dose isolada de CGP 42112 1ng não apresenta diferença significativa quando comparada ao grupo controle. Portanto, a dose de 1ng de CGP 42112 reverte o efeito da Ang II e não promove efeito próprio sobre este comportamento.

➤ *Latência de Locomoção*

As tabelas I, II e III não mostram diferença significativa da latência de locomoção para as doses injetadas quando comparadas ao grupo controle.

➤ *Latência de Ejaculação*

A tabela I mostra um aumento significativo da latência de ejaculação nas doses de Ang II: 25pg, 50pg e 100pg quando são comparadas ao grupo controle.

A tabela II mostra um aumento significativo da latência de ejaculação nas doses de Ang II 50pg, e uma reversão deste efeito na coinjeção de Ang II 50pg com Los 10ng, quando as doses são comparadas ao grupo controle. A mesma tabela também mostra que a dose isolada de Losartan 10ng não apresenta diferença significativa quando comparada ao grupo controle. Portanto, Losartan reverte o aumento da latência de ejaculação, promovido pela Ang II, sem exercer efeito intrínseco nesta dose.

A tabela III mostra um aumento significativo da latência de ejaculação nas doses de Ang II 50pg, e uma reversão deste efeito na coinjeção de Ang II 50pg com CGP 42112 1ng, quando as doses são comparadas ao grupo controle. A mesma tabela mostra que a dose isolada de CGP 42112 1ng não apresenta diferença significativa quando comparada ao grupo controle. Isto mostra que o CGP 42112 reverte o efeito da Ang II sem apresentar efeito próprio sobre este item comportamental.

FIGURA III - Frequência de Intromissão

Gráfico 1

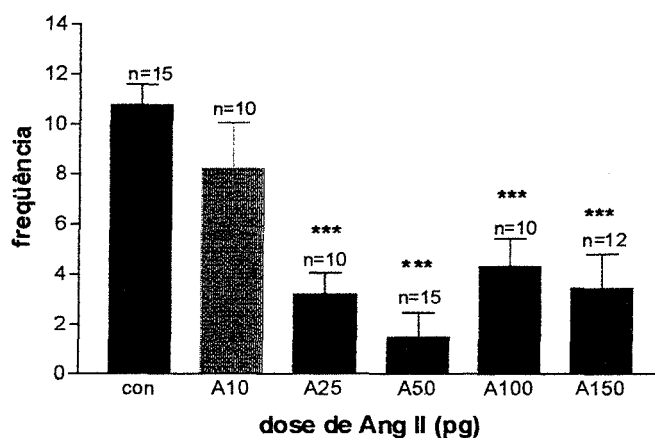


Gráfico 2

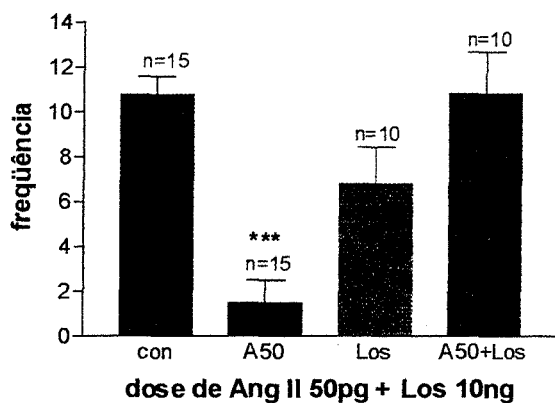


Gráfico 3

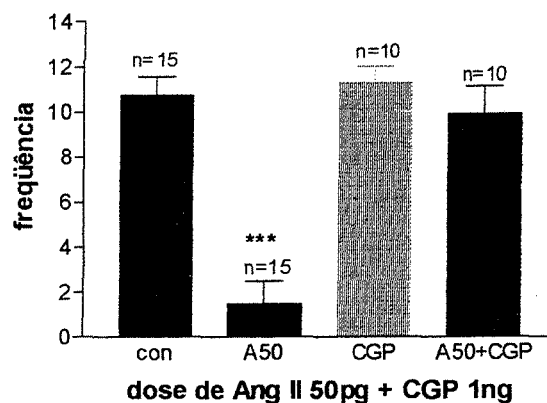


Figura III - Frequência de intromissão de ratos machos obtida em sessões de observação de 10 min após injeções na AME de Ang II em diferentes doses, Losartan 10ng e CGP 1ng. Os valores são expressos como média (\pm EPM) para $p < 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) quando comparados ao controle.

FIGURA IV - Frequência de Monta

Gráfico 1

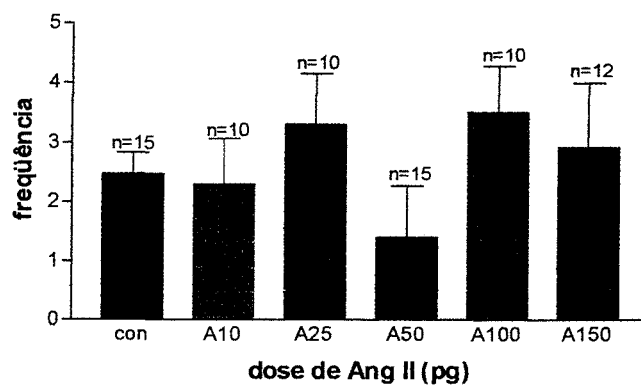


Gráfico 2

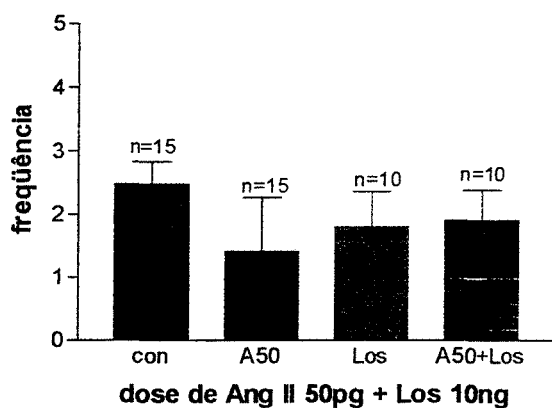


Gráfico 3

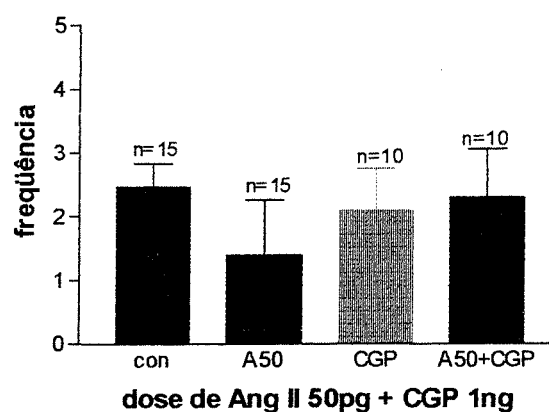


Figura IV - Frequência de monta de ratos machos obtida em sessões de observação de 10min após injeções na AMe de Ang II em diferentes doses, Losartan 10ng e CGP 1ng. Os valores são expressos como média (\pm EPM) para $p < 0,05$ quando comparados ao controle.

FIGURA V - Frequência de Exploração dos Genitais

Gráfico 1

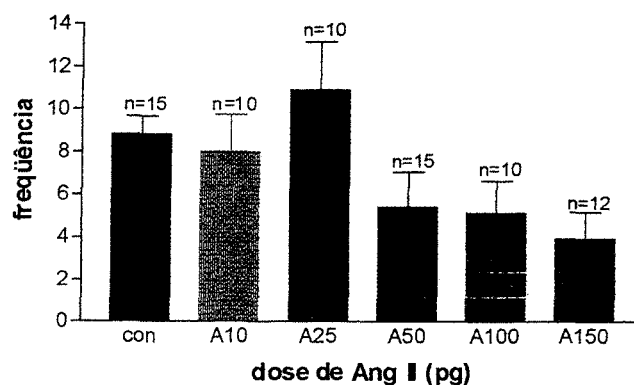


Gráfico 2

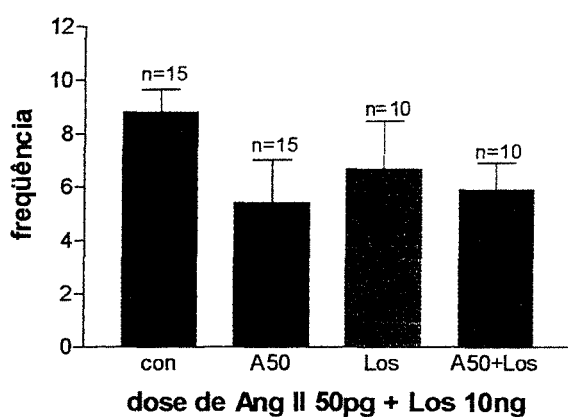


Gráfico 3

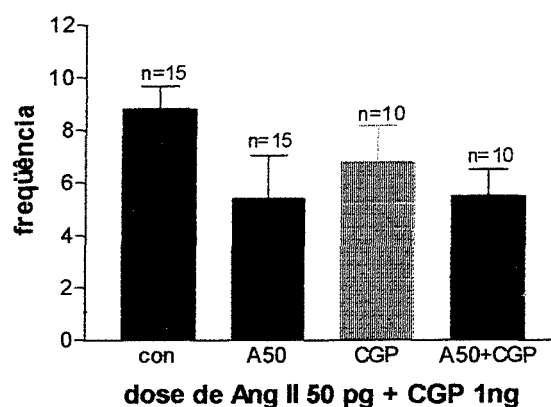


Figura V- Frequência de exploração dos genitais de ratos machos obtida em sessões de observação de 10 min após injeções na AME de Ang II em diferentes doses, Losartan 10ng e CGP 1ng. Os valores são expressos como média (\pm EPM) para $p < 0,05$ quando comparados ao controle.

FIGURA VI - Freqüência de Locomoção

Gráfico 1

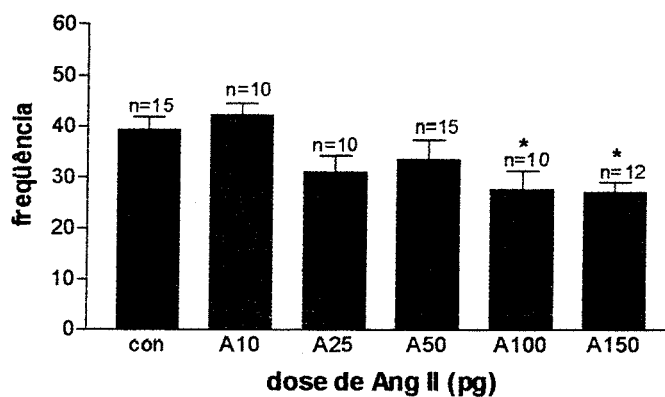


Gráfico 2

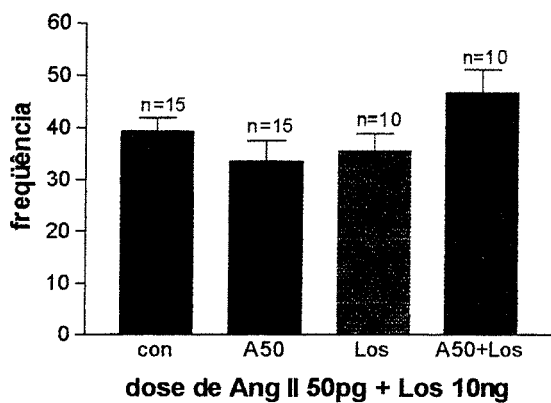


Gráfico 3

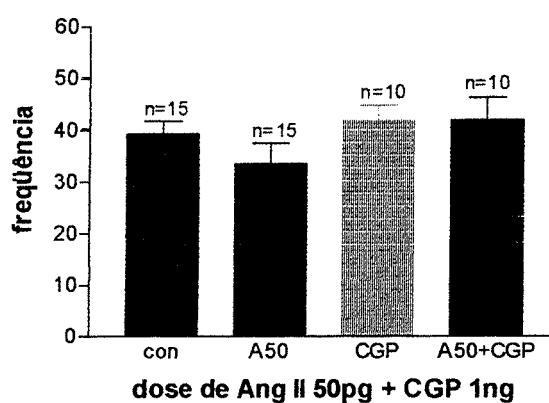


Figura VI - Freqüência de locomoção de ratos machos obtida em sessões de 10 min após injeções na AME de Ang II em diferentes doses, Losartan 10ng e CGP 1ng. Os valores são expressos como média (\pm EPM) para $p < 0,05$ (* $p < 0,05$) quando comparados ao controle.

FIGURA VII - Duração de Locomoção

Gráfico 1

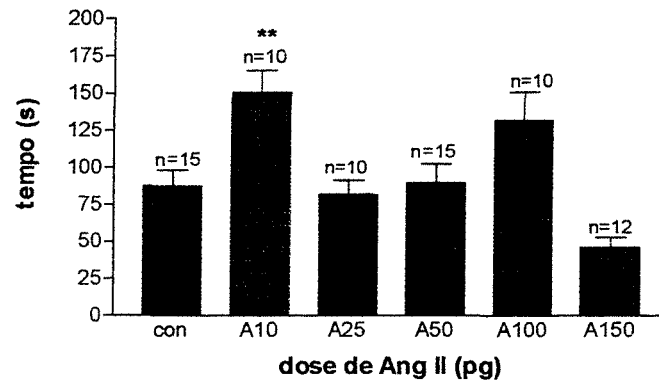


Gráfico 2

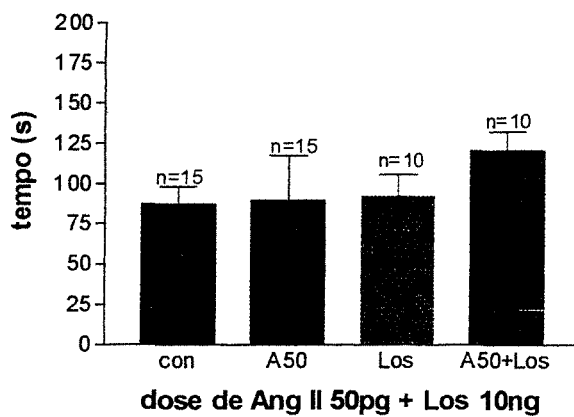


Gráfico 3

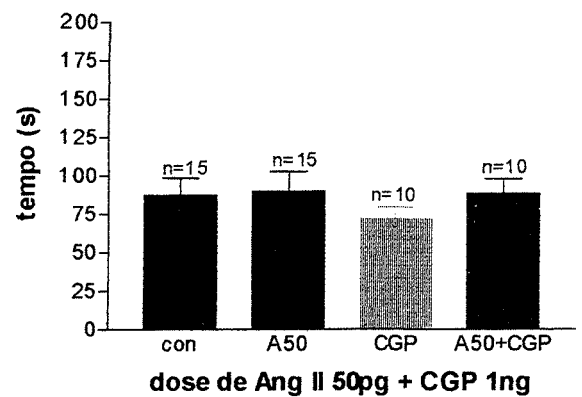


Figura VII - Duração de locomoção de ratos machos obtida em sessões de observação de 10 min após injeções na AME de Ang II em diferentes doses, Losartan 10ng e CGP 1ng. Os valores são expressos como média (\pm EPM) para $p < 0,05$ (** $p < 0,01$) quando comparados ao controle.

FIGURA VIII - Duração do Intervalo Pós-ejaculatório

Gráfico 1

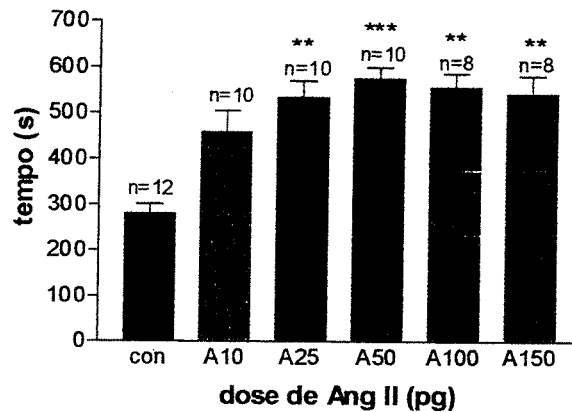


Gráfico 2

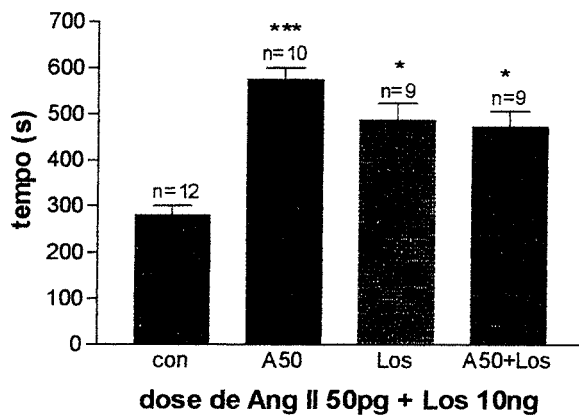


Gráfico 3

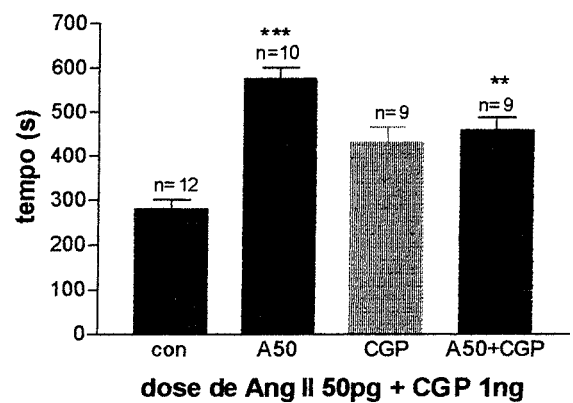


Figura VIII - Duração do intervalo pós-ejaculatório de ratos machos obtida em sessões de observação de 30 min após injeções na AMe de Ang II em diferentes doses, Losartan 10ng e CGP 1ng. Os valores são expressos como média para $p < 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) quando comparados ao controle.

TABELA I - Efeito de diferentes doses de Angiotensina II sobre a latência de diferentes parâmetros comportamentais:

	con (n=15)	A 10pg (n=10)	A 25pg (n=10)	A 50pg (n=15)	A 100pg (n=10)	A 150pg (n=12)
LM	29,0 (13,0/175,5)	309,0 (225,0/547,0)	84,5 (44,5/500,0)	600,0 ^c (142,5/600,0)	91,0 (42,5/367,0)	345,0 (40,5/600,0)
LI	18,0 (15,5/31,5)	86,5 (34,0/171,0)	78,5 (49,0/101,0)	600,0 ^a (600,0/600,0)	112,0 ^b (77,0/373,0)	600,0 ^a (59,5/600,0)
LEG	12,0 (6,0/24,5)	22,0 (19,5/77,0)	17,5 (9,0/24,0)	74,0 ^a (49,5/486,0)	17,0 (11,5/39,5)	25,0 (16,5/446,0)
LL	6,0 (3,5/10,0)	8,0 (6,0/9,0)	6,5 (4,5/8,0)	9,0 (5,0/29,0)	12,0 (7,0/16,0)	13,5 (5,5/34,0)
LE	874,0 (720/975)	801,0 (719/1800)	1800,0 ^c (1460/1800)	1800,0 ^b (1800/1800)	1800,0 ^c (1530/1800)	1800,0 (1390/1800)

Tabela I - Latência dos diferentes parâmetros comportamentais (LM = latência de monta; LI = latência de intromissão; LEG = latência de exploração dos genitais; LL = latência de locomoção; LE = latência de ejaculação) após injeções de diferentes doses de Ang II (10pg, 25pg, 50pg, 100pg, 150pg) no núcleo da AMe. Os registros foram realizados em sessões de 10 min (600 s) para a latência de monta, intromissão, exploração dos genitais e locomoção. Para a latência de ejaculação, o registro foi realizado em sessão de 30 min (1800 s). Os valores são expressos como mediana e intervalo interquartil para $p < 0,05$ (a = $p < 0,001$; b = $p < 0,01$; c = $p < 0,05$) quando comparados ao controle.

TABELA II - Efeito da dose de Ang II 50pg e Losartan 10ng sobre a latência de diferentes parâmetros comportamentais:

	con (n=15)	A 50pg (n=15)	Los 10ng (n=10)	A 50pg+Los 10ng (n=10)
LM	29,0 (13,0/175,5)	600,0 ^c (142,5/600,0)	154,5 (90,5/471,0)	109,0 (30,0/222,0)
LI	18,0 (15,5/31,5)	600,0 ^b (600,0/600,0)	15,0 (10,5/23,0)	19,0 (15,5/27,0)
LEG	12,0 (6,0/24,5)	74,0 ^a (49,5/486,0)	16,5 (12,0/29,5)	13,5 (9,5/21,5)
LL	6,0 (3,5/10,0)	9,0 (5,0/29,0)	3,0 (2,5/5,0)	3,5 (2,5/6,0)
LE	874,0 (720/975)	1800,0 ^b (1800/1800)	1140,0 (752/1355)	885,0 (776/993)

Tabela II - Latência dos diferentes parâmetros comportamentais (LM = latência de monta; LI = latência de intromissão; LEG = latência de exploração dos genitais; LL = latência de locomoção; LE = latência de ejaculação) após injeções isoladas de Ang II 50pg e Losartan 10ng, e após coinjeções de Ang II 50pg com Los 10ng no núcleo da AMe. Os registros foram realizados em sessões de 10 min (600 s) para a latência de monta, intromissão, exploração dos genitais e locomoção. Para a latência de ejaculação, o registro foi realizado em sessão de 30 min (1800 s). Os valores são expressos como mediana e intervalo interquartil para $p < 0,05$ ($a = p < 0,001$; $b = p < 0,01$; $c = p < 0,05$) quando comparados ao controle.

TABELA III - Efeito da dose de Ang II 50pg e CGP 42112 1ng sobre a latência de diferentes parâmetros comportamentais:

	con (n=15)	A 50pg (n=15)	CGP 1ng (n=10)	A 50pg+CGP 1ng (n=10)
LM	29,0 (13,0/175,5)	600,0 ^c (142,5/600,0)	114,0 (13,0/483,5)	67,5 (30,5/293,5)
LI	18,0 (15,5/31,5)	600,0 ^a (600,0/600,0)	12,0 (8,5/16,0)	36,5 (14,0/45,0)
LEG	12,0 (6,0/24,5)	74,0 ^a (49,5/486,0)	11,0 (9,0/19,0)	22,5 (18,0/23,0)
LL	6,0 (3,5/10,0)	9,0 (5,0/29,0)	4,5 (3,0/12,5)	5,0 (4,5/11,0)
LE	874,0 (720/975)	1800,0 ^a (1800/1800)	795,0 (670/801)	1050,0 (843/1070)

Tabela III - Latência dos diferentes parâmetros comportamentais (LM = latência de monta; LI = latência de intromissão; LEG = latência de exploração dos genitais; LL = latência de locomoção; LE = latência de ejaculação) após injeções isoladas de Ang II 50pg e CGP 42112 1ng, e após co-injeções de Ang II 50pg com CGP 42112 1ng no núcleo da AMe. Os registros foram realizados em sessões de 10 min (600 s) para a latência de monta, intromissão, exploração dos genitais e locomoção. Para a latência de ejaculação, o registro foi realizado em sessão de 30 min (1800 s). Os valores são expressos como mediana e intervalo interquartil para $p < 0,05$ (a = $p < 0,001$; c = $p < 0,05$) quando comparados ao controle.

TABELA IV - Resultados percentuais quanto ao parâmetro comportamental freqüência

% dos animais que executaram determinado comportamento						
	con (n = 15)	A 50pg (n=15)	Los 10ng (n = 10)	CGP 1ng (n = 10)	A 50pg+Los 10ng (n=10)	A 50pg+CGP 1ng (n = 10)
FI	100%	13,33%	80%	100%	90%	100%
FM	93,33%	33,33%	70%	70%	80%	80%
FEG	100%	80%	80%	100%	90%	100%
FL	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Tabela IV - Resultados percentuais quanto ao parâmetro comportamental freqüência (**FI** = freqüência de intromissão; **FM** = freqüência de monta; **FEG** = freqüência de exploração dos genitais; **FL** = freqüência de locomoção) após injeções isoladas de Ang II 50pg, Losartan 10ng e CGP 42112 1ng, e após coinjeções de Ang II 50pg com Losartan 10ng e Ang II 50pg com CGP 42112 1ng no núcleo da AMe. Os registros foram realizados em sessões de 10 min.

TABELA V - Resumo geral dos resultados

	Ang II (50pg)	Losartan	CGP42112	AngII+Los	AngII+CGP
LI	↑↑	-	-	-	-
FI	↓↓	-	-	-	-
LM	↑↑	-	-	-	-
FM	-	-	-	-	-
LEG	↑↑	-	-	-	-
FEG	-	-	-	-	-
LL	-	-	-	-	-
FL	-	-	-	-	-
DL	-	-	-	-	-
LE	↑↑	-	-	-	-
DIP	↑↑	↑↑	-	↑↑	↑↑

Tabela IV - Resumo geral dos resultados após 15 min das injeções intracerebrais (na AMe) de Ang II 50pg, Losartan 10ng, CGP 42112 1ng, Ang II 50pg com Losartan 10ng e Ang II 50pg com CGP 42112 1ng. Os itens comportamentais registrados foram: Latência de Intromissão (LI), Frequência de Intromissão (FI), Latência de Monta (LM), Frequência de Monta (FM), Latência de Exploração dos Genitais (LEG), Frequência de Exploração dos Genitais (FEG), Latência de Locomoção (LL), Frequência de Locomoção (FL), Duração de Locomoção (DL), Latência de Ejaculação (LE) e Duração do Intervalo Pós-ejaculatório (DIP). O símbolo (↑↑) refere-se ao aumento do comportamento específico quando a substância é injetada, o símbolo (↓↓) refere-se à diminuição do comportamento específico quando a substância é injetada e o símbolo (-) demonstra que o efeito da substância injetada não é diferente do controle.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado para testar a hipótese de que a Ang II, um importante regulador da pressão arterial e do equilíbrio hidro-eletrolítico está envolvida na modulação do comportamento sexual de ratos machos. Os resultados indicam que microinjeções de Ang II promovem uma diminuição no comportamento sexual de ratos machos quando a substância é injetada diretamente na AMe.

Para uma melhor elucidação dos resultados deste trabalho, optou-se por realizar uma curva dose-efeito da Ang II objetivando isolar uma determinada concentração da mesma que pudesse caracterizar de maneira mais consistente a ação do peptídeo sobre o comportamento sexual de ratos machos sexualmente ativos. Dentre as concentrações pesquisadas, a dose de Ang II 50pg foi a de escolha estando seu efeito sobre o comportamento sexual de acordo com dados da literatura que indicam uma diminuição deste comportamento em ratos machos quando o peptídeo é administrado por via icv (Clark, 1989; Keaton & Clark, 1998). O uso de competidores para os receptores de Ang II, o ligando não-peptídico Losartan, que apresenta afinidade para o receptor AT₁, sendo também um medicamento utilizado como anti-hipertensivo, e o peptídico CGP 42112, com afinidade para o receptor AT₂, ambos injetados diretamente na AMe de maneira isolada ou em coinjeção com a Ang II, foram usados para identificar o tipo de receptor envolvido na ação da Ang II.

Como visto na introdução, os componentes do comportamento sexual de ratos machos podem ser categorizados como libido e potência (Bitran & Hull, 1987). A libido de um animal pode ser estabelecida pela latência e frequência de monta, latência de intromissão e duração do intervalo pós-ejaculatório. A potência pode ser

medida pela frequência de intromissão e ejaculação (eficácia copulatória); pela frequência de intromissão, latência de ejaculação e duração do intervalo pós-ejaculatório (taxa copulatória); e pela frequência de intromissão e latência de ejaculação (limite ejaculatório) (Bitran & Hull, 1987; Chan e cols., 1999).

A medida mais comum do comportamento pré-copulatório é a latência da monta onde evidencia-se a motivação sexual do macho (Sachs & Meissel, 1988). De todas as medidas de comportamento sexual, a latência de monta é considerada a mais conveniente para a motivação sexual, porque esta não requer que o macho tenha potencial ereção peniana. A latência e a frequência da exploração dos genitais também são consideradas como itens de medida da motivação sexual, lembrando-se que a exploração dos genitais pode anteceder ou não a monta (Sachs & Meisel, 1988).

O presente estudo mostra que o aumento progressivo da concentração das doses injetadas de Ang II no núcleo da AMe, dentro da curva dose-efeito para o peptídeo, leva a um aumento da latência de monta e da exploração dos genitais, sugerindo uma diminuição da motivação sexual dos machos sexualmente experientes em relação a fêmeas receptivas, apesar da frequência da exploração dos genitais não ter sido afetada. A administração de Ang II no terceiro ventrículo, em concentrações requeridas para estimular o comportamento de beber, suprime a motivação sexual dos ratos machos (Clark, 1989). O aumento da latência de monta e da exploração dos genitais não são evidenciados na injeção isolada dos antagonistas do receptor AT₁, Losartan, e do receptor AT₂, CGP 42112. Este efeito, induzido pela infusão de Ang II, é revertido quando coinjectado o peptídeo com os seus competidores. Estes dados indicam que o aumento da latência de monta e da exploração dos genitais, promovido pela Ang II, é mediado por receptores AT₁ e AT₂. O fato do antagonista

Losartan não exercer influência sobre a latência de monta, quando administrado de forma aguda, é reforçado por trabalhos mostrando que a administração do anti-hipertensivo por via naso-gástrica, por um curto espaço de tempo, em ratos geneticamente hipertensos, não altera a performance sexual dos mesmos, e somente o uso crônico do medicamento aumenta significativamente a latência de monta, sugerindo um decréscimo da libido nestes animais, embora outros parâmetros comportamentais não tenham sido alterados e não tenha promovido nenhum efeito em ratos normotensos (Chan e cols., 1999).

Tanto a Ang II quanto seus competidores não afetam a frequência da monta, assim como a frequência de exploração dos genitais quando as doses são injetadas na AMe de ratos machos sexualmente ativos. Pesquisas recentes mostram que a infusão icv de Ang II diminui em 40% o número de montas de ratos injetados em relação ao controle (Keaton & Clark, 1998). A frequência de monta, estudada isoladamente, não é um parâmetro comportamental para análise da motivação sexual, já que esta é um índice ambíguo da performance do comportamento sexual, pois o aumento de sua medida pode resultar de um aumento da motivação sexual, decréscimo da sensibilidade peniana ou erétil, decréscimo da receptividade da fêmea ou a combinação destes fatores (Sachs & Meisel, 1988).

A frequência de intromissão é considerada uma medida do mecanismo ejaculatório do animal, sendo bastante apropriada em tratamentos que afetam a potência erétil do macho ou a sensibilidade peniana (Sachs & Meissel, 1988). Para alguns autores a redução na frequência de intromissão é definida como uma facilitação para a ejaculação, porém outros autores têm definido que a redução pode ser interpretada como uma forma de disfunção sexual (Bitran & Hull, 1987). Considerando as duas linhas opostas quanto à definição da frequência de

intromissão, esta, ao ser estudada de maneira isolada, não é um item comportamental que defina, por si só, a potência sexual de um rato macho quando este pode ejacular. Por isso, há de se comparar vários comportamentos em conjunto.

O presente trabalho mostra que o aumento progressivo da concentração das doses injetadas de Ang II no núcleo da AMe, dentro da curva dose-efeito para o peptídeo, diminui a frequência de intromissão. Estes dados contradizem a literatura, onde resultados recentes revelam que a frequência de intromissão e o número de animais exibindo intromissão não são afetados quando a Ang II é injetada icv (Keaton & Clark, 1998). Esta discrepância pode ser devida à via de administração, que neste trabalho é usada a injeção direta na AMe.

A diminuição da frequência de intromissão não é evidenciada na presença do antagonista do receptor AT_1 , Losartan, o mesmo ocorrendo na presença do antagonista do receptor AT_2 , CGP 42112, ambos não apresentando efeito próprio quando administrados diretamente na AMe. As doses selecionadas dos competidores, Losartan e CGP 42112, e da Ang II, quando coinjetadas, mostram uma reversão do efeito inibitório promovido pela injeção isolada de Ang II, indicando uma resposta modulatória do receptor AT_1 e do receptor AT_2 no comportamento de intromissão quando o peptídeo é administrado na AMe.

O efeito da Ang II sobre o comportamento sexual também é observado quando o parâmetro analisado é a latência da intromissão. A Ang II, injetada diretamente na AMe, aumenta a latência de intromissão. Isto não é demonstrado na injeção dos competidores Losartan e CGP 42112, sendo que ambos revertem o efeito exacerbado pela Ang II quando coinjetados com o peptídeo, também mostrando o papel mediador dos receptores AT_1 e AT_2 . Estes dados são reforçados pela literatura, onde pesquisas recentes indicam que a Ang II administrada icv diminui o

comportamento copulatório dos ratos machos, o que foi evidenciado pelo aumento da latência para iniciar a cópula (Keaton & Clark, 1998).

A potência sexual do animal também pode ser medida através da latência de ejaculação e da duração do intervalo pós-ejaculatório (Sachs & Meissel, 1988). No presente estudo, a infusão de Ang II na AMe, aumenta tanto a latência de ejaculação dos ratos quanto a duração do intervalo pós-ejaculatório. O aumento da latência de ejaculação é revertido nas coinjeções da Ang II com seus antagonistas, Losartan e CGP 42112. Trabalhos prévios descrevem uma diminuição no comportamento sexual de ratos machos após administração de Ang II icv, onde mostram um aumento da latência para ejaculação, bem como um aumento na duração do intervalo pós-ejaculatório, e significativa diminuição da ereção quando testado o reflexo peniano (Keaton & Clark, 1998).

Uma análise minuciosa dos resultados no que diz respeito ao efeito dos competidores da Ang II, indica que o Losartan não apresenta efeito intrínseco na maioria dos parâmetros comportamentais estudados. A exceção ocorre na duração do intervalo pós-ejaculatório em que o Losartan apresenta um efeito similar ao da Ang II. Neste parâmetro comportamental, onde o Losartan comporta-se como um agonista, ele também produz uma reversão, somente parcial, do efeito da Ang II, indicando que, neste parâmetro específico, o Losartan age como um agonista / antagonista parcial. O CGP 42112, por sua vez, não apresenta atividade intrínseca em nenhum dos parâmetros estudados. Em relação ao efeito antagonista, ele não reverte completamente o efeito produzido pela Ang II somente quanto a duração do intervalo pós-ejaculatório, em que se revela um antagonista parcial.

Resumindo os dados deste estudo, estes mostram que a Ang II aumenta a latência da monta, da intromissão e da exploração dos genitais, assim como diminui a

frequência de intromissão, aumenta a latência da ejaculação e a duração do intervalo pós-ejaculatório. Isto revela que a Ang II diminui tanto a libido quanto a potência sexual dos ratos machos sexualmente experientes quando o peptídeo é injetado na AMe. Os resultados desta investigação também indicam que a infusão tanto da Ang II, quanto dos seus competidores Losartan e CGP 42112, na AMe, não influenciam a atividade locomotora do animal, pois a frequência, a latência e a duração da locomoção não apresentam alterações. Isto sugere que a Ang II promove um efeito específico sobre o comportamento sexual, preservando a habilidade locomotora do animal. Dados prévios mostram que a infusão icv de Ang II de forma crônica não foi associada com o decréscimo na atividade motora geral dos ratos submetidos a testes comportamentais (Keaton & Clark, 1998).

No complexo amigdalóide, dados comprovam a existência de receptores AT_2 (Tsutsumi & Saavedra, 1991), detectados em cérebro de ratos de oito semanas de vida pós-natal, sendo que em resultados recentes também foi demonstrada a presença do receptor AT_1 em núcleos basolateral, medial e central da amígdala (Halbach & Albrecht, 1998). Pesquisas prévias indicam que a Ang II icv induz à diminuição do comportamento sexual dos ratos machos envolvendo a interação do receptor AT_1 , sendo que o antagonista Losartan bloqueia completamente o efeito da Ang II quanto ao aumento da latência de intromissão e do intervalo inter-ejaculatório, e atenua o efeito do aumento na latência de ejaculação nos ratos geneticamente hipertensos (Keaton & Clark, 1998). Estes dados evidenciam uma ação central da Ang II na regulação do comportamento copulatório em ratos machos, sendo que os efeitos do não-peptídeo Losartan indicam o papel do receptor AT_1 nesta regulação (Keaton & Clark, 1998).

Apesar das exceções quanto a atividade dos competidores da Ang II sobre a duração do intervalo pós-ejaculatório, os resultados indicam que, na maioria dos itens comportamentais estudados, as doses injetadas na AMe tanto do não-peptídeo Losartan quanto do peptídeo CGP 42112, ambos coinjectados com Ang II, revertem o efeito inibitório promovido pela Ang II administrada isoladamente, sugerindo que o comportamento sexual é modulado tanto pelo receptor AT₁ quanto pelo receptor AT₂, o que está de acordo com os estudos de mapeamento dos receptores de Ang II na AMe. O efeito de atenuação do comportamento sexual demonstrado quando a Ang II é administrada diretamente na AMe pode ser consequência da ativação de uma rota metabólica inibitória via receptor AT₁ ou receptor AT₂ quando a Ang II ativa estes receptores ou por um efeito inibitório direto.

Considerando que a Ang II interage com vários neurotransmissores e/ou neuropeptídeos, atuando como um neuromodulador (Paul e cols., 1993; Wright & Harding, 1992), como citado na introdução, cabe salientar, que a atividade do neurotransmissor inibitório GABA é desigualmente distribuída no complexo amigdalóide de ratos, sendo que uma grande atividade deste neurotransmissor foi detectada na AMe (Fonnum & Storm-Mathisen, 1978). O GABA pode estar sendo liberado por uma rota metabólica via receptor AT₁ ou receptor AT₂, o que poderia justificar este efeito inibitório do comportamento sexual. Pesquisas prévias têm mostrado uma influência regulatória da neurotransmissão gabaérgica no comportamento copulatório de ratos machos e na função erétil peniana. Durante o intervalo pós-ejaculatório, a concentração de GABA no líquido cerebrospinal aumenta drasticamente, o que sugere uma influência inibitória do GABA na atividade copulatória (Bitran & Hull, 1987). Tanto os sítios GABA_A quanto GABA_B estão implicados na modulação do comportamento copulatório, onde sua estimulação

central atenua o comportamento de monta, intromissão e ejaculação, e inibe o reflexo peniano (Bitran & Hull, 1987).

Interessante observar nos resultados deste trabalho que tanto o antagonista AT₁ como AT₂ revertem quase completamente os efeitos produzidos pela Ang II. Este achado sugere uma possível interação entre os dois sistemas de receptores. Resultados recentes mostram que quando a Ang II ativa os receptores AT₁ e AT₂, ambos agem mutuamente, porém com efeitos hemodinâmicos opostos, onde o receptor AT₂ regula e modula as funções do SNC incluindo ações comportamentais (Ichiki e cols., 1995).

Estudos prévios têm demonstrado a relação da Ang II com a regulação da reprodução (Palmer e cols., 1994; Steger & Bartke, 1995). Os efeitos da Ang II na secreção dos hormônios gonadotrópicos são modificados por esteróides gonadais, transmissores adrenérgicos e neuropeptídeo Y (Steger & Bartke, 1995; Steele, 1992). Transmissores adrenérgicos também estão envolvidos na regulação da pressão sanguínea e na função sexual (Pfaus & Phillips, 1991). A Ang II modula a secreção de hormônios gonadotrópicos, como também interage com transmissores noradrenérgicos (Steele e cols., 1985) e modifica a transmissão adrenérgica no sistema nervoso simpático (Lenkei e cols., 1995; Mendelsohn e cols., 1993; Chan e cols., 1999).

Para Keaton & Clark (1998), mudanças no comportamento copulatório consistentes com o decréscimo da motivação sexual e habilidade erétil são vistas como associadas com a indução da hipertensão e da polidipsia induzidas pela Ang II quando o peptídeo é administrado por via icv.

Considerando que a AMe é um núcleo importante na geração e modulação do comportamento sexual, conforme apresentado na introdução, a Ang II, administrada

diretamente neste núcleo, revela-se como um neuromodulador e/ou neurotransmissor. Este efeito ocorre através de sistemas de receptores AT₁ e AT₂, conforme os resultados obtidos com a coinjeção da Ang II com os competidores específicos, indicando uma potencial interação entre esses receptores. O mecanismo celular pelo qual a Ang II exerce esse efeito inibitório não está esclarecido, e estudos futuros devem ser propostos com a finalidade específica de investigar se esta inibição é fruto direto da ação da Ang II sobre sistemas iônicos que modulam a excitabilidade neural ou ocorre através da ativação de sistemas de neurotransmissores inibitórios tipo GABA.

Este trabalho demonstrou um efeito direto da Ang II na AMe, produzindo a inibição do comportamento sexual, o que reforça a importância deste núcleo na mediação deste comportamento, assim como revela o papel da Ang II como um neuromodulador das funções vitais.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

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

- a) A Ang II, administrada na AMe, promove uma diminuição no comportamento sexual de ratos machos, evidenciado pela diminuição tanto da libido quanto da potência sexual dos animais frente a fêmeas receptivas;
- b) O antagonista do receptor AT_1 , Losartan, não apresenta atividade intrínseca na maioria dos parâmetros estudados, tendo como exceção a duração do intervalo pós-ejaculatório, onde se revela como um agonista/antagonista parcial.
- c) O antagonista do receptor AT_2 , CGP 42112, não apresenta atividade intrínseca em nenhum dos parâmetros estudados, embora se revele como um antagonista parcial sobre a duração do intervalo pós-ejaculatório.
- d) O efeito inibitório da Ang II injetada na AMe sobre o comportamento sexual de ratos machos é mediado tanto pelo receptor tipo AT_1 como pelo receptor tipo AT_2 . O fato torna-se evidente pelos resultados que demonstram uma reversão deste efeito inibitório da Ang II pelos dois receptores.
- e) A Ang II, assim como seus competidores, Losartan e CGP 42112, não influenciam sobre a atividade locomotora dos ratos machos, o que mostra um efeito específico do peptídeo na diminuição do comportamento sexual destes animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDRED, G.P., CHAI, S.Y., SONG, K., ZHUO, J., MACGREGOR, D.P. & MENDELSON, F.A. Distribution of angiotensin II receptor subtypes in the rabbit brain. **Regul. Pept.**, 19;44(2):119-30, 1993.
- ANDREOLI, T.E., CULPEPPER, R.M., THOMPSON, C.S. & WEINMAN, E.J. Hipertensão Arterial. In: ANDREOLI, T.E., CARPENTER, C.J., PLUM, F. & SMITH, L.S.J., eds. **Medicina Interna Básica**, 2ª ed., 28:176-180, 1991.
- BARNES, J.M., STEWARD, L.J., BARBER, P. C. & BARNES N.M. Identification and characterisation of angiotensin II receptor subtypes in human brain. **European Journal Pharmacology**, 230(3): 251-8, 1993.
- BARNES, N.M., COSTALL, B., KELLY, M.E., MURPHY, D.A. & NAYLOR, R. J. Anxiolytic-like action of DuP753, a non-peptide angiotensin II receptor antagonist. **Neuroreport.**, 1: 20-1, 1990.
- BEACH, F. A. Cerebral and hormonal control of reflexive mechanisms involved in copulatory behavior. **Endocrinology**, 47(57): 289-316, 1967.
- BEAN, N. J. , NUNEZ, A. A. & CONNER, R. Effects of medial preoptic lesions on male mouse ultrasonic vocalizations and copulatory behavior. **Brain Research Bulletin**, 6: 109-12, 1981.
- BEDECS, K., ELBAZ, N., SUTREN, M., MASSON, M., SUSINI, C., STROSBERG, A.D. & NAHMIAS, C. Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase. **The Journal of Biochemistry**, 325:449-54, 1997.
- BELCHEVA, I., GEORGIEV, V., CHOBANOVA, M. & HADJIIVANOVA, C. Behavioral effects of angiotensin II microinjected into CA1 hippocampal area. **Neuropeptides**, 31: 60-4, 1997.
- BENARROCH, E.E. & SCHMEICHEL, A.M. Immunohistochemical localization of angiotensin II type 1 receptor in human hypothalamus and brainstem. **Brain Research**, 812:292-6, 1998.
- BEVAN, P. 5-HT and sexual behavioural. In: BEVAN, P. , COOLS, A. R. & ARCHER, T. Behavioural Pharmacology of 5-HT. **New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates**, pgs:33-4, 1989.
- BITRAN, D. & HULL, E. Pharmacological analysis of male rat sexual behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 11: 365-389, 1987.

- BOTTARI, S. P., GASPARO, M., STECKELINGS, U. M., & LEVENS, N. R. Angiotensin II receptor subtypes: characterization, signalling mechanisms and possible physiological implications. **Frontiers in Neuroendocrinology**, 14(2): 123-71, 1993.
- BRASZKO, J.J., KULAKOWSKA, A. & WINNICKA, M.M. CGP 42112A abolishes facilitation of recognition caused by angiotensin II and angiotensin II (3-7) in rats. **Acta Neurobiol. Exp.**, 57(3): 227-34, 1997.
- BUMPUS, F.M., CATT, K. J., CHIU, A. T., de GASPARO, M., GOODFRIEND, T., HUSAIN, A., PEACH, M. J., TAYLOR, D.C. & TIMMERMANN P.B.M. W.M. Nomenclature for angiotensin receptors. **Hypertension**, 17: 720-1, 1991.
- CHAN, P., LIU, J-C., TONG Y-C., CHEN Y-J., WANG C-C., TOMLINSON, B. & CHENG J-T. Effects of losartan on the sexual behavior of male rats. **Pharmacology**, 58: 132-9, 1999.
- CIUFFO, G.M., ALVAREZ, S.E. & FUENTES, L.B. Angiotensin II receptors induce tyrosine dephosphorylation in rat fetal membranes. **Regulation Peptides**, 74(2-3):129-35, 1998.
- CLARK, J. T. A Possible role for angiotensin II in the regulation of male sexual behavior in rats. **Physiology & Behavior**, 45: 221-46, 1989.
- DAVIDSON, J.M. Characteristics of Sex behavior in male rats following castration. **Animal Behavior**, 14: 266-272, 1966.
- DORNELLES, R.C.M. & FRANCI, C.R. Action of AT₁ subtype angiotensin II receptors of the medial preoptic area on gonadotropins and prolactin release. **Neuropeptides**, 32(1):51-5, 1998.
- FERNANDEZ, B. E. & DOMINGUEZ, A.E. Angiotensin II increases MAO activity in rat central nervous system. **Rev-Esp-Fisiol.**, 47(1): 37-40, 1991.
- FERRARIO, C. M., ROBSON, A.S.S., BROSNIHAN, K. B., BLOCK, C. H., SCHIAVONE, M.T., KHOSLA, M. C. & GREENE L. J. A hypothesis regarding the function of angiotensin peptides in the brain. **Clin. and Exper. - Theory and Practice**, A10(1): 107-21, 1988.
- FITZSIMONS, J. T. Angiotensin stimulation of the central nervous system. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, 87:117-167, 1980.
- FITZSIMONS, J. T. Angiotensin, thirst and sodium appetite. **Physiology Review**, 78(3): 583-686, 1998.
- FONNUM, F. & STORM-MATHISEN, J. Localization of GABA-ergic neurons in the CNS. In: IVERSEN, L., IVERSEN, S. & SNYDER, S.H. eds. **Chemical**

Pathways in the Brain - Handbook of Psychopharmacology, New York, Plenum Press, vol.9, pgs:388-391, 1978.

- FRANCI, C.R., ANSELMO-FRANCI, J.A. & McCANN, S.M. Angiotensin II antiserum decreases luteinizing hormone-releasing hormone in the median eminence and preoptic area of the rat. **Brazilian Journal Med. Biol. Research**, 23:899-901, 1990.
- GALLINAT, S., YU, M., DORST, A., UNGER, T. & HERDEGEN, T. Sciatic nerve transection evokes long lasting up-regulation of angiotensin AT₂ and AT₁ Receptor mRNA in adult rat dorsal root ganglia and sciatic nerves. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, 57:111-22, 1998.
- GANONG, W. Reproduction and the renin-angiotensin system. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 19(2):241-50, 1995.
- GEHLERT, D. R., GACKENHEIMER, S. L. & SCHOBERT, D.A. Angiotensin II receptor subtypes in rat brain: dihydrothreitol inhibits ligand binding to AII-1 and enhances binding to AII-2. **Brain Research**, 546(1): 161-5, 1991.
- GOODFRIEND, T. L., ELLIOTT, M.E. & CATT, K. J. Angiotensin receptors and their antagonists. In: WOOD, A. J.J., ed. **Drug Therapy**, 334(25): 1649-54, 1996.
- GREENSTEIN, A., CHEN, J., MILLER, H., MATZKIN, H., VILLA, Y. & BRAF, Z. Does severity of ischemic coronary disease correlate with erectile function? **Int. Journal Impotence Research**, 9(3):123-6, 1997.
- HALBACH, O.B. & ALBRECHT, D. Mapping of angiotensin AT₁ receptors in the rat limbic system. **Regulation Peptides**, 78(1-3): 51-6, 1998.
- HARLAN, R.E. , SHIVERS, B.D. , MOSS, R.L. , SHRYNE, J.E. & GORSKI, R. A. Sexual performance as a function of time of day in male and female rats. **Biology of Reproduction**, 23: 64-71, 1980.
- HILLEGART, V. Functional topography of brain serotonergic pathways in the rat. **Acta Physiologica Scandinavica**, 142: 1-54, 1991.
- HÖHLE, S., BLUME, A., LEBRUN, C., CULMAN, J. & UNGER, T. Angiotensin receptors in the brain. **Pharmacology & Toxicology**, 77: 306-15, 1995.
- HOWES, L.G. & CHRISTIE, N. Angiotensin receptor antagonists and ACE inhibitors. **Aust. Fam. Physician**, 27(10):914-21, 1998.
- HUANG, X-C., RICHARDS, E.M. & SUMNERS, C. Mitogen-activated protein kinases in rat brain neuronal cultures are activated by angiotensin II type 1 receptors and inhibited by angiotensin II type 2 receptors. **The Journal of Biological Chemistry**, 271(26):15635-41, 1996.

- HUCKLE, W. R. & EARP, H.S. Regulation of cell proliferation and growth by angiotensin II. **Prog-Growth-Factor-Res.**, 5(2): 177-94, 1994.
- 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**, 377(6551):748-50, 1995.
- JO, H., YANG, E. K., LEE, W.J., PARK, K.Y., KIM, H.J. & PARK, J.S. Gene expression of central and peripheral renin-angiotensin system components upon dietary sodium intake in rats. **Regulation Peptides**, 67(2):115-21, 1996.
- JOHNSTON, R.E. Olfactory and vomeronasal mechanisms of communication. In: Pfaff, D. W., ed. **Taste, olfaction and the central nervous system**. 322-46, 1985.
- JÖHREN, O. & SAAVEDRA, J.M. Expression of AT1A and AT1B angiotensin II receptor messenger RNA in forebrain of 2-week-old rats. **American Journal of Physiology**, 271:E104-12, 1996.
- JÖHREN, O., SANVITTO, G.L., EGIDY, G. & SAAVEDRA, J.M. Angiotensin II AT₁A receptor mRNA expression is induced by estrogen-progesterone in dopaminergic neurons of the female rat arcuate nucleus. **The Journal of Neuroscience**, 17(21):8283-92, 1997.
- KAKINUMA, Y., HAMA, H., SUGIYAMA, F., GOTO, K., MURAKAMI, K. & FUKAMIZU, A. Anti-apoptotic action of angiotensin fragments to neuronal cells from angiotensinogen knock-out mice. **Neuroscience Lett.**, 232(3): 167-70, 1997.
- KARPAS, A. E., BREMNER, W.J., CLIFTON, D.K., STEINER, R. A. & DORSA, D. M. Diminished luteinizing hormone pulse frequency and amplitude with aging in the male rat. **Endocrinology**, 112: 788-792, 1983.
- KEATON, A. K. & CLARK, J. Effects of angiotensin II on sexual function, blood pressure and fluid intake are differentially affected by AT-1 receptor blockade. **Physiology & Behavior**, 64: 339-346, 1998.
- KELLY, D. & JESSEL, T. Sexo e o cérebro. Em: KANDEL, E., SCHWARTZ, J.H. & JESSEL, T.M., eds. **Fundamentos da Neurociência e do Comportamento**, Rio de Janeiro, Prentice-Hall do Brasil Ltda., pgs:463-73, 1997.
- KONDO, Y., SACHS, B.D. & SAKUMA, Y. Differential role of rat medial amygdala in the regulation of erection in the three contexts, **Soc. Neurosci. Abstr.**, 21(2):1464, 1995.
- KREGEL, K. C., STAUSS, H. & UNGER, T. Modulation of autonomic nervous system adjustments to heat stress by central angiotensin II receptor antagonism. **American Journal Physiology**, 266(6 Pt 2): R1985-91, 1994.

- LAFLAMME, L., BRECHLER, V., REUDELHUBER, T.L., GALLO-PAYET, N. & DESCHEPPER, C.F. The renin-angiotensin system in hybrid NG 108-15 cells. Renin gene is from mouse neuroblastoma, angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme genes are of rat glioma origin. **Regulation Peptides**, 77(1-3):9-15, 1998.
- LANDAU, T. & MADDEN, J.E. Hormonal regulation of female proceptivity and its influence on male sexual preference in rats. **Physiology & Behavior**, 31: 679-85, 1983.
- LENKEI, Z., PALKOVITS, M., CORVOL, P. & CORTES, C. L. Expression of angiotensin type-1 (AT₁) and type-2 (AT₂) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. **Frontiers in Neuroendocrinology**, 18(4): 383-439, 1997.
- LENKEI, Z., CORVOL, P. & LLORENS-CORTES, C. The angiotensin receptor subtype AT₁A predominates in rat forebrain areas involved in blood pressure, body fluid homeostasis and neuroendocrine control. **Molecular Brain Research**, 30:53-60, 1995.
- LI, H-Y, BLAUSTEIN, J.D., DeVRIES, G.J. & WADE, G.N. Estrogen receptor immunoreactivity in the hamster brain : preoptic area, hypothalamus and amygdala. **Brain Research**, 631:304-12, 1993.
- LUCION, A. B., RAMOS, R.A., VOGEL, W. & RASIA-FILHO, A.A. Effect of 8-OH-DPAT on sexual behavior of adult and newborn male rats. Annals of the 1993, **Annual Meeting of the Society for Neuroscience**, Washington, DC, 1993.
- MARTENS, J.R., WANG, D., SUMNERS, C., POSNER, P. & GELBAND, C.H. Angiotensin II type 2 receptor-mediated regulation of rat neuronal K⁺ channels. **Circulation Research**, 79(2):302-9, 1996.
- MARTIN, J. Sistema Límbico. Em: MARTIN, J., ed. **Neuroanatomia: texto e atlas**, Porto Alegre, Artes Médicas, 2^a ed., pgs:447-78, 1998.
- MARTIN, K.A., GRANT, S.G. & HOCKFIELD, S. The mas proto-oncogene is developmentally regulated in the rat central nervous system. **Brain Res. Dev. Brain Res.**, 68(1): 75-82, 1992.
- MAS, M. del CASTILLO, A.R., GUERRA, M., DAVIDSON, J.M. & BATTANER, E. Neurochemical correlates of male sexual behavior. **Physiology & Behavior**, 41: 341-5, 1987.
- MASCÓ, D.H. & CARRER, H.F. Sexual receptivity in female rats after lesions or stimulation in different amygdaloid nuclei. **Physiology & Behavior**, 24:1073-80, 1990.

- MATSUSAKA, T. & ICHIKAWA, I. Biological functions of angiotensin and its receptors. **Annual Review Physiology**, 59: 395-412, 1997.
- MATUSZCZYK, V. J. & LARSSON, K. Sexual orientation and sexual motivation of the adult male rat. **Physiology & Behavior**, 53: 747-50, 1993.
- McGREGOR, A. & HERBERT, J. Differential effects of excitotoxic basolateral and corticomedial lesions of the amygdala on the behavioural and endocrine responses to either sexual or aggression-promoting stimuli in the male rat. **Brain Research**, 574(1-2):9-20, 1992.
- 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 Research**, 675(1-2): 231-40, 1995.
- McKINLEY, M.J., McALLEN, R.M., PENNINGTON, G.L., SMARDENCAS, A., WEISINGER, R.S. & OLDFIELD, B.J. Physiological actions of angiotensin II mediated by AT₁ and AT₂ receptors in the brain. **Clin. Exp. Pharmacology and Physiology- Supplement**, 3:S99-104, 1996.
- MEISEL, R.L., LUMIA, A.R. & SACHS, B.D. Effects of olfactory bulb removal and flank shock on copulation in male rats. **Physiology & Behavior**, 25: 383-7, 1980.
- MENDELSON, F.A.O., JENKINS, T.A. & BERKOVIC, S.F. Effects of angiotensin II on dopamine and serotonin turnover in the striatum of conscious rats. **Brain Research**, 613:221-9, 1993.
- MENDELSON, S. D. & PFAUS, J. G. Level searching: a new assay of sexual motivation in the male rat. **Physiology & Behavior**, 45: 337-341, 1989.
- MERABET, L., de GASPARO, M. & CASANOVA, C. Dose-dependent inhibitory effects of angiotensin II on visual responses of the rat superior colliculus: AT₁ and AT₂ receptor contributions. **Neuropeptides**, 31(5):469-81, 1997.
- MILLAN, M.A., JACOBOWITZ, D.M., AGUILERA, G. & CATT, K.J. Differential distribution of AT₁ and AT₂ angiotensin II receptor subtypes in the rat brain during development. **Neurobiology**, 88:11440-4, 1991.
- MILSTED, A., NISHIMURA, M., BROSNIHAN, K.B. & FERRARIO, C.M. Differential regulation of angiotensinogen transcripts after renin infusion. **Hypertension**, 28(4):678-81, 1996.
- MO, Z. L. , KATAFUCHI T., MURATANI, H. & HORI, T. Effects of vasopressin and angiotensin-II on neurones in the rat dorsal motor nucleus of the vagus in vitro. **Journal of Physiology**, 458: 561-77, 1992.
- MOREAU, C., RASOLONJANAHARY, R., AUDINOT, V., KORDON, C. & ENJALBERT, A. Angitensin II effects on second messengers involved in

prolactin secretion are mediated by AT₁ receptor in anterior pituitary cells. **Molecular and Cellular Neurosciences**, 5:597-603, 1994.

MORGAN, L., PIPKIN, F.B. & KALSHEKER, N. Angiotensinogen: molecular biology, biochemistry and physiology. **Int. Journal Biochemistry Cell Biology**, 28(11):1211-22, 1996.

MUNGALL, B.A., SHINKEL, T.A. & SERNIA, C. Immunocytochemical localization of angiotensinogen in the fetal and neonatal rat brain. **Neuroscience**, 67(2):505-24, 1995.

PALMER, A.A., STEELE, M.K., SHACKELFORD, R.L. & GANONG, W.F. Intravenous losartan inhibits the increase in plasma luteinizing hormone and water intake produced by intraventricular angiotensin II. In: Losartan, water intake and LH secretion. **Society for Experimental Biology and Medicine**, San Francisco, vol. 205, pgs:263-6, 1994.

PAUL, M., BADER, M., STECKELINGS, U. M., VOIGTLANDER, T. & GANTEN, D. The renin-angiotensin system in the brain. localization and functional significance. **Arzneimittelforschung**, 43: 207-13, 1993.

PAXINOS, G. & WATSON, C. **The rat nervous system**. Austrália, Academic Press, 1986.

PEACH, M.J. & DOSTAL, D.E. The angiotensin II receptor and the actions of the angiotensin II, **Journal Cardiovasc. Pharmacol.**, 16(4):S25, 1990.

PFAUS, J.G. & PHILLIPS, A.G. Role of dopamine in anticipatory and consummatory aspects of sexual behavior in the male rat. **Behavioral Neuroscience**, 105(5):727-43, 1991.

POLIDORI, C., CICCOCIOPPO, R., POMPEI, P., CIRILLO, R. & MASSI, M. The selective angiotensin AT₁ receptor antagonist LR-B/081 potently inhibits drinking induced by central injection of angiotensin II in rats. **European Journal Pharmacology**, 277: 223-8, 1995.

PRADO, G. **Pensares VI**. ed. La Salle, pg: 37(75), 1989.

RASIA-FILHO, A.A., PERES, T.M.S., CUBILLA-GUTIERREZ, F.H. & LUCION, A.B. Effect of estradiol implanted in the corticomedial amygdala on the sexual behavior of castrated male rats. **Brazilian Journal Medical Biology Research**, 24:1041-9, 1991.

RASIA-FILHO, A.A., RAMOS, R.A. & LUCION, A.B. Avaliação temporal da ocorrência de padrões do comportamento sexual em ratos machos. **Anais do XX Encontro Anual de Ciências Fisiológicas**, Porto Alegre, 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**, 14: 358-78, 1993.
- SACHS, B. & MEISEL, R. The physiology of male sexual behavior. In : KNOBIL, E. & NEIL, J. **The Physiology of Reproduction**. New York, Raven Press, pp. 1393-1485, 1988.
- SACHS, B. D. & BARFIELD, R. J. Temporal patterning of sexual behavior in the male rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, 73(3):359-64, 1970.
- SANVITTO, G.L., JÖHREN, O., HÄUSER, W. & SAAVEDRA, J.M. Water deprivation upregulates Ang II AT₁ binding and mRNA in rat subfornical organ and anterior pituitary. **American Journal of Physiology**, 273 (1 Pt 1):E156-63, 1997.
- SCHNUR, S. L. , SMITH, E. R. , LEE, R.L. , MAS, M. & DAVIDSON, J. M. A component analysis of effects of DPAT on male rat sexual behavior. **Physiology & Behavior**, 45: 897-901, 1989.
- SHENOY, U.V., RICHARDS, E.M., HUANG, X-C. & SUMNERS, C. Angiotensin II type 2 receptor-mediated apoptosis of cultured neurons from newborn rat brain. **Endocrinology**, 140(1):500-9, 1999.
- SHIMOIKE, H., IWAI, N. & KONOSHITA, M. Genetic analysis of renin gene expression in the central nervous system of spontaneously hypertensive rats. **Neuroscience Lett.**, 221 (2-3):133-6, 1997.
- SONG, K., ALLEN, A. M., PAXINOS, G. & MENDELSON F.A. Mapping of angiotensin II receptor subtype heterogeneity in rat brain. **The Journal of Comparative Neurology**, 316(4): 467-84, 1992.
- STEELE, M.K. The role of brain angiotensin II in the regulation of luteinizing hormone and prolactin secretion. **Trends Endocrinology and Metabolism**, 3(8):295-301, 1992.
- STEELE, M.K., GALLOO, R.V. & GANONG, W.F. Stimulatory or inhibitory effects of angiotensin II upon LH secretion in ovariectomized rats: a function of gonadal steroids. **Neuroendocrinology**, 40:210-6, 1985.
- STEGER, R. W. & BARTKE, A. Neuroendocrine control of reproduction. In: MUKHOPADHYAY, A.K. & RAIZADA, M.K., eds. **Tissue Renin-Angiotensin Systems**, New York, Plenum Press, 2: 15-32, 1995.
- TAYLOR, G. T., WEISS, J. & RUPICH, R. Male rat behavior, endocrinology and reproductive physiology in a mixed-sex, socially stressful colony. **Physiology & Behavior**, 39: 429-33, 1987.

- 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. **Pharmacological Sciences Perspectives**, Massachusetts, Birkhäuser Boston, pgs: 37-59, 1995.
- TSUTSUMI, K. & SAAVEDRA, J. M. Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT₁ and AT₂) in the rat brain. **American Journal Physiology**, 261: R209-16, 1991.
- UNGER, T., CHUNG, O., CSIKOS, T., CULMAN, J., GALLINAT, S., GOHLKE, P., HOHLE, S., MEFFERT, S., STOLL, M., STROTH, U. & ZHU, Y.Z. Angiotensin receptors. **The Journal of Hipertension - Supplement**, 14(5): S95-103, 1996.
- WEE, B.E.F. & CLEMENS, L.G. Environmental influences on masculine sexual behavior in mice. **Physiology & Behavior**, 46: 867-72, 1989.
- WINNICKA, M.M. 6-OHDA bilateral lesions to the amygdala abolish the memory enhancing effect of angiotensin II in rats. **Pharmacology Research**, 38(1):53-8, 1998.
- WINNICKA, M.M., BRASZKO, J.J. & WISNIEWSKI, K. Dopaminergic projection to the septum mediates facilitatory effect of angiotensins on recognition memory in rats. **Pharmacology Research**, 36(5):387-94, 1997.
- WOOD, R. Thinking about networks in the control of male hamster sexual behavior. **Hormones and Behavior**, 32(1):40-45, 1997.
- WOOD, R.I. & NEWMAN, S.W. Hormonal influence on neurons of the mating behavior pathway in male hamsters. In: MICEVYCH, P.E. & HAMMER, R.P.J. eds., **Neurobiological Effects of Sex Steroid Hormones**, Cambridge, Cambridge Univ. Press, pgs: 3-39, 1995.
- WRIGHT, J. W. & HARDING J. W. Regulatory role of brain angiotensins in the control of physiological and behavioral responses. **Brain Research Reviews**, 17: 227-262, 1992.
- WU, R.A., KAILASAM, M.T., CERVENKA, J.H., PARMER, R.J., KENNEDY, B.P., ZIEGLER, M.G. & O'CONNOR, D.T. Does lipophilicity of angiotensin converting enzyme inhibitors selectively influence autonomic neural function in human hypertension? **The Journal of Hipertension**, 12(11): 1243-7, 1994.
- ZHUO, J., MOELLER, I., JENKINS, T., CHAI, S.Y., ALLEN, A. M., OHISHI, M. & MENDELSON, F.A. Mapping tissue angiotensin-converting enzyme and angiotensin AT₁, AT₂ and AT₄ receptors. **Journal of Hipertension**, 16(12 Pt 2): 2027-37, 1998.