

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

**AVALIAÇÃO TEMPORAL DOS EFEITOS DA HIPERTENSÃO
RENOVASCULAR SOBRE A FUNÇÃO REPRODUTIVA DE RATOS**

Karin Viana Weissheimer

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Luiz Sanvitto

Coorientador: Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Fisiologia

Porto Alegre

- 2011 -

"Quem, algum dia, aprenderá a voar,
deve antes aprender a ficar de pé,
a caminhar, a correr,
subir em árvore, bailar..."

Friedrich Nietzsche

AGRADECIMENTOS

A Deus pela dádiva da vida e por conceder-me saúde para realizar os meus sonhos.

Ao Prof. Gilberto L. Sanvitto pela orientação e por compartilhar seus conhecimentos e, sobretudo, pela confiança no desenvolvimento desta tese.

Ao Prof. Aldo B. Lucion pela contribuição intelectual neste estudo.

Ao meu pai (*in memoriam*), exemplo de integridade. A minha mãe e irmãos pelo amor e compreensão na minha ausência em vários momentos.

A todos os colegas de laboratório: Marcelo Souza, Jeferson, Ozni, Sara, Adolfo, Carol, Marcinha, Felipe, Kika e Bruno, pela amizade e coleguismo.

Aos meus grandes amigos, Patrícia Feksa, Ana Lúcia Cecconelo, Charles e Silvana, por todo apoio, carinho e momentos de alegria.

À Prof. Adriane Belló-Klein por disponibilizar o Laboratório de Fisiologia Cardiovascular para realização da mediada da pressão arterial dos animais.

Ao Prof. Celso Franci e Prof. Jarbas R. de Oliveira pelo auxílio nas dosagens hormonais integrantes deste estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia pela oportunidade de realizar a minha formação neste curso.

Às secretárias do PPG-Fisiologia, Sílvia e Alice, por todo auxílio prestado.

À CAPES pelo apoio financeiro.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização do meu doutorado.

SUMÁRIO

Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
Abreviaturas.....	x
Lista de Figuras.....	xii
Lista de Tabelas.....	xv
I- INTRODUÇÃO.....	01
1. Angiotensina II.....	02
2. Modelo de Hipertensão de Goldblatt – Dois Rins e Um Clipe.....	06
3. Função Reprodutiva.....	07
4. Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonadal.....	07
5. Comportamento Sexual dos Machos.....	10
5.1. Áreas Encefálicas que Regulam o Comportamento Sexual de Roedores.....	12
6. Gônadas Masculinas e Espermatogênese.....	14
7. Participação da Angiotensina II na Função Reprodutiva e suas Interações Neuroendócrinas.....	16
8. Losartan.....	18
II- JUSTIFICATIVA.....	20
III- OBJETIVOS.....	21
1. Objetivo Geral.....	21
2. Objetivos Específicos.....	21
IV- MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
1. Animais.....	22
2. Desenho Experimental.....	23

2.1. Experimento 1 – Análise temporal do comportamento sexual e parâmetros endócrino-reprodutivos de ratos com hipertensão arterial induzida pelo modelo 2R1C.....	23
2.2. Experimento 2 – Análise dos efeitos do tratamento com o antagonista dos receptores AT1, losartan, sobre o comportamento sexual e parâmetros endócrino-reprodutivos de ratos submetidos ao modelo 2R1C.....	25
3. Preparo das fêmeas para a experiência sexual dos machos.....	27
4. Iniciação da experiência sexual dos machos.....	27
5. Teste de desempenho sexual.....	28
6. Procedimentos cirúrgicos: modelo de Goldblatt tipo I (2R1C) e cirurgia fictícia.....	28
7. Registro do comportamento sexual.....	29
8. Medida da pressão arterial sistólica.....	31
9. Coleta de sangue.....	32
10. Dosagens plasmáticas de Angiotensina II, Hormônio Luteinizante, Testosterona, Prolactina e Corticosterona.....	32
11. Relação peso renal/peso corporal.....	34
12. Avaliação da espermatogênese.....	34
12.1. Quociente de espermátides (QE) e produção espermática diária (PED).....	34
12.2. Trânsito epididimário (TE).....	35
13. Tratamento com Losartan.....	36
14. Análise estatística.....	37
V- RESULTADOS.....	39
1. Experimentos.....	39

1.1. Experimento 1 – Análise temporal do comportamento sexual e parâmetros endócrino-reprodutivos de ratos com hipertensão arterial induzida pelo modelo 2R1C.....	39
1.1.1. Pressão Arterial Sistólica (PAS).....	39
1.1.2. Relação peso renal/peso corporal.....	41
1.1.3. Dosagens hormonais.....	44
1.1.3.1. Angiotensina II.....	44
1.1.3.2. Hormônio Luteinizante.....	46
1.1.3.3. Testosterona.....	48
1.1.3.4. Prolactina.....	50
1.1.3.5. Corticosterona.....	52
1.1.4. Comportamento Sexual.....	54
1.1.5. Espermatogênese.....	58
1.1.5.1. Quociente de Espermátides (QE).....	58
1.1.5.2. Trânsito Epididimário Total (TE).....	60
1.2. Experimento 2 – Análise dos efeitos do tratamento com o antagonista dos receptores AT1, losartan, sobre o comportamento sexual e parâmetros endócrino-reprodutivos de ratos submetidos ao modelo 2R1C.....	62
1.2.1. Pressão Arterial Sistólica (PAS).....	62
1.2.2. Relação peso renal/peso corporal.....	64
1.2.3. Dosagens hormonais.....	66
1.2.3.1. Angiotensina II.....	66
1.2.3.2. Hormônio Luteinizante.....	68
1.2.3.3. Testosterona.....	69
1.2.3.4. Prolactina.....	70

1.2.3.5. Corticosterona.....	71
1.2.4. Comportamento Sexual.....	72
1.2.5. Espermatogênese.....	75
1.2.5.1. Quociente de Espermátides (QE).....	75
1.2.5.2. Trânsito Epididimário Total (TE).....	76
VI- DISCUSSÃO.....	77
1. Ações da angiotensina II na origem e manutenção da hipertensão arterial no modelo 2R1C.....	78
2. Participação da angiotensina II na modulação da função reprodutiva de ratos 2R1C.....	81
3. Participação da testosterona na modulação da função reprodutiva de ratos 2R1C.....	83
4. Participação do hormônio luteinizante na modulação da função reprodutiva de ratos 2R1C.....	85
5. Participação da prolactina na modulação da função reprodutiva de ratos 2R1C.....	87
6. Participação da corticosterona na função reprodutiva de ratos.....	89
7. Inibição da Espermatogênese de ratos 2R1C.....	91
8. Efeitos do antagonismo dos receptores AT1 sobre a função reprodutiva de ratos 2R1C.....	94
VII- CONCLUSÕES.....	101
VIII- PERSPECTIVAS.....	104
IX- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO.....	133
ARTIGO “Temporal analysis of reproductive function in a male rat model of two-kidney, one-clip hypertension”.....	134

RESUMO

Existe uma associação entre hipertensão arterial e prejuízo da função reprodutiva. No modelo experimental dois-rins, um-clipe (2R1C), a hipertensão de origem renovascular é estabelecida pelo aumento na produção de angiotensina II (Ang II). O presente estudo analisou a evolução temporal dos efeitos da hipertensão promovida pelo modelo 2R1C sobre a função reprodutiva de ratos, bem como a participação dos receptores de Ang II do tipo 1 (AT1) nesse processo. Para tanto, avaliamos as manifestações do comportamento sexual, da gametogênese e das concentrações plasmáticas de Ang II, hormônio luteinizante (LH), testosterona, prolactina e corticosterona de ratos submetidos ao modelo 2R1C (*clipados*) ou à cirurgia fictícia (controle) pertencentes aos grupos 7, 14, 21 e 28 dias de procedimento cirúrgico. Essas mesmas análises dos parâmetros endócrinos e do comportamento sexual foram realizadas em outros dois grupos, após 28 dias de *clipamento* ou cirurgia fictícia, que receberam o tratamento com losartan, um antagonista dos receptores AT1. Os ratos dos quatro grupos analisados, aos 7, 14, 21 e 28 dias de *clipamento*, sem o tratamento com losartan, apresentaram um aumento nas concentrações plasmáticas de Ang II e uma resposta hipertensora, quando comparados aos seus respectivos controles. As demais análises das dosagens hormonais mostram que o emprego do modelo 2R1C promoveu redução nas concentrações plasmáticas de LH somente no grupo 7 dias de *clipamento* e elevação do LH circulante nos grupos 21 e 28 dias de *clipamento*. As concentrações plasmáticas de prolactina aumentaram nos grupos 14, 21 e 28 dias de *clipamento*. Além disso, ocorreu diminuição nas concentrações plasmáticas de testosterona no grupo 28 dias de *clipamento*. Por outro lado, não houve alterações nas concentrações plasmáticas de corticosterona em nenhum grupo. Todos os animais *clipados* manifestaram inibição de um ou mais parâmetros do comportamento sexual, ocorrendo maior comprometimento desta função com o avanço temporal da hipertensão. Os grupos 21 e 28 dias de *clipamento* também apresentaram um dano da espermatogênese. O tratamento com losartan normalizou a pressão arterial e preveniu as alterações da prolactina, do LH, do comportamento sexual e da espermatogênese de ratos *clipados* por 28 dias. Somado a isso, o losartan ocasionou uma elevação nas concentrações plasmáticas de testosterona no grupo *clipado* e produziu um aumento na Ang II circulante nos grupos controle e *clipado* por 28 dias. Os resultados deste estudo evidenciam que a Ang II exerce influência modulatória sobre parâmetros endócrinos e comportamentais da função reprodutiva, representando um dos principais elementos determinantes do comprometimento do comportamento sexual e da espermatogênese de ratos com hipertensão renovascular.

ABSTRACT

There is an association between hypertension and reproductive function impairment. In the two-kidney, one-clip model (2K1C), the renovascular hypertension is established by plasma angiotensin II (Ang II) increases. The present study aimed to analyze the temporal evolution of hypertension effects on rat reproductive function submitted to a 2K1C model. It was also analyzed the AT1 receptors participation in this process. Sexual behavior manifestations, gametogenesis and plasmatic concentrations of Ang II, luteinizing hormone (LH), testosterone, prolactin and corticosterone in rats submitted to 2K1C model (clipping) or to sham surgery (control) from groups at 7, 14, 21 and 28 days after surgery were evaluated. These endocrine parameters and sexual behavior analysis were conducted in two other groups after 28 days of 2K1C or sham surgery, which received losartan treatment - an AT1 receptor antagonist. The rats from the four groups on days 7, 14, 21, and 28 after clipping procedure, without losartan treatment, showed an increase in plasma Ang II levels and a hypertensive response, compared to their respective control groups. The other hormonal measurements showed that the 2K1C model caused a reduction in plasma LH only in the 7 days after clipping procedure group and a plasma LH elevation in the 21 and 28 days after clipping groups. Plasma prolactin increased in 14, 21, and 28 days after clipping procedure groups. Moreover, there was a decrease in plasma testosterone in the 28 days after clipping group. On the other hand, there were no changes in plasma corticosterone in any group. All clipping animals showed inhibition of one or more sexual behavior parameters and the temporal advancement of hypertension promoted a greater impairment in this function. The 21 and 28 days after clipping procedure groups presented spermatogenesis dysfunction. Losartan treatment normalized the blood pressure and prevented the changes on plasma prolactin and LH levels, sexual behavior and spermatogenesis after 28 days clipping procedure. In addition, losartan treatment caused a rise in plasma testosterone clipping group levels and an increase in circulating Ang II control and clipping group levels after 28 days of surgery procedure. Together, these results suggest that Ang II acts modulating behavioral and endocrine parameters of reproductive function in a 2K1C rat model. Therefore, Ang II seems to represent one of the major elements inducing sexual behavior and spermatogenesis impairment in rats with renovascular hypertension.

ABREVIATURAS

- 2R1C - dois rins e um clipe
- ACTH - hormônio adrenocorticotrófico
- ADH - hormônio antidiurético
- AMe - amígdala medial
- Ang I - angiotensina I
- Ang II - angiotensina II
- APOM - área pré-óptica medial
- AT1 - receptores de Ang II do tipo 1
- AT2 - receptores de Ang II do tipo 2
- CE - concentração de espermatozoides
- CRH - hormônio corticotrófico
- ECA - enzima conversora de angiotensina
- ELISA - enzyme linked immunosorbent assay
- EM - eminência mediana
- FICT - cirurgia fictícia de colocação de clipe renal
- FSH - hormônio folículo-estimulante
- GnRH - hormônio liberador de gonadotrofinas
- HHG - eixo hipotálamo-hipófise-gonadal
- LH - hormônio luteinizante
- LHRH - hormônio liberador do hormônio luteinizante

- LOS - losartan
- OCV - órgãos circunventriculares
- PAS - pressão arterial sistólica
- PED - produção espermática diária
- PRD/PC - relação peso renal direito/peso corporal
- PRE/PC - relação peso renal esquerdo/peso corporal
- PVN - núcleo paraventricular do hipotálamo
- QE - quociente de espermátides
- RIE - radioimunoensaio
- RNAm - ácido ribonucleico mensageiro
- RVLM - bulbo ventro-lateral rostral
- SHR - ratos espontaneamente hipertensos
- SNC - sistema nervoso central
- SNP - sistema nervoso periférico
- SRA - sistema(s) renina-angiotensina
- SNS - sistema nervoso simpático
- TE - trânsito epididimário
- VMH - núcleo ventromedial do hipotálamo

LISTA DE FIGURAS

IV- MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 1: Resumo esquemático dos grupos do Experimento 1.....25

Figura 2: Resumo esquemático do Experimento 226

V- RESULTADOS

Figura 3: Alterações na pressão arterial sistólica de ratos submetidos à cirurgia fictícia ou *clipamento* da artéria renal nos grupos 7, 14, 21 e 28 dias após procedimento cirúrgico.....40

Figura 4: Aspecto macroscópico do rim esquerdo, estenótico, e do rim contralateral direito, que não recebeu aplicação do clipe, de um rato pertencente ao grupo 28 dias de *clipamento*.....44

Figura 5: Concentrações plasmáticas de angiotensina II de ratos submetidos à cirurgia fictícia ou *clipamento* da artéria renal nos grupos 7, 14, 21 e 28 dias após procedimento cirúrgico.....45

Figura 6: Diferenças percentuais de aumento nas concentrações plasmáticas de angiotensina II nos grupos 7, 14, 21 e 28 dias após o *clipamento* da artéria renal, quando comparados aos seus respectivos controles.....46

Figura 7: Concentrações plasmáticas de hormônio luteinizante de ratos submetidos à cirurgia fictícia ou *clipamento* da artéria renal nos grupos 7, 14, 21 e 28 dias após procedimento cirúrgico.....47

Figura 8: Concentrações plasmáticas de testosterona de ratos submetidos à cirurgia fictícia ou <i>clipamento</i> da artéria renal nos grupos 7, 14, 21 e 28 dias após procedimento cirúrgico.....	49
Figura 9: Concentrações plasmáticas de prolactina de ratos submetidos à cirurgia fictícia ou <i>clipamento</i> da artéria renal nos grupos 7, 14, 21 e 28 dias após procedimento cirúrgico.....	51
Figura 10: Concentrações plasmáticas de corticosterona de ratos submetidos à cirurgia fictícia ou <i>clipamento</i> da artéria renal nos grupos 7, 14, 21 e 28 dias após procedimento cirúrgico.....	53
Figura 11: Quociente de espermátides de ratos submetidos à cirurgia fictícia ou <i>clipamento</i> da artéria renal nos grupos 7, 14, 21 e 28 dias após procedimento cirúrgico.....	59
Figura 12: Trânsito epididimário total de ratos submetidos à cirurgia fictícia ou <i>clipamento</i> da artéria renal nos grupos 7, 14, 21 e 28 dias após procedimento cirúrgico.....	61
Figura 13: Alterações na pressão arterial sistólica após 28 dias de cirurgia fictícia ou <i>clipamento</i> da artéria renal em ratos que receberam veículo ou tratamento com losartan.....	63
Figura 14: Concentrações plasmáticas de angiotensina II após 28 dias de cirurgia fictícia ou <i>clipamento</i> da artéria renal em ratos que receberam veículo ou tratamento com losartan.....	67
Figura 15: Concentrações plasmáticas de hormônio luteinizante após 28 dias de cirurgia fictícia ou <i>clipamento</i> da artéria renal em ratos que receberam veículo ou tratamento com losartan.....	68

Figura 16: Concentrações plasmáticas de testosterona após 28 dias de cirurgia fictícia ou <i>clipamento</i> da artéria renal em ratos que receberam veículo ou tratamento com losartan.....	69
Figura 17: Concentrações plasmáticas de prolactina após 28 dias de cirurgia fictícia ou <i>clipamento</i> da artéria renal em ratos que receberam veículo ou tratamento com losartan.....	70
Figura 18: Concentrações plasmáticas de corticosterona após 28 dias de cirurgia fictícia ou <i>clipamento</i> da artéria renal em ratos que receberam veículo ou tratamento com losartan.....	71
Figura 19: Quociente de espermátides após 28 dias de cirurgia fictícia ou <i>clipamento</i> da artéria renal em ratos que receberam veículo ou tratamento com losartan.....	75
Figura 20: Trânsito epididimário total após 28 dias de cirurgia fictícia ou <i>clipamento</i> da artéria renal em ratos que receberam veículo ou tratamento com losartan.....	76

LISTA DE TABELAS

V- RESULTADOS

Tabela 1: Relações peso renal e peso corporal de ratos submetidos à cirurgia fictícia ou <i>clipamento</i> da artéria renal nos grupos 7, 14, 21 e 28 dias após procedimento cirúrgico.....	43
Tabela 2: Comportamento sexual de ratos submetidos à cirurgia fictícia ou <i>clipamento</i> da artéria renal nos grupos 7, 14, 21 e 28 dias após procedimento cirúrgico.....	56
Tabela 3: Relações peso renal e peso corporal após 28 dias de cirurgia fictícia ou <i>clipamento</i> da artéria renal em ratos que receberam veículo ou tratamento com losartan.....	65
Tabela 4: Comportamento sexual após 28 dias de cirurgia fictícia ou <i>clipamento</i> da artéria renal em ratos que receberam veículo ou tratamento com losartan.....	73

I- INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica é uma doença crônica prevalente em cerca de um quarto da população mundial (Kearney et al., 2005), contribuindo significativamente para a grande incidência de infartos do miocárdio, acidentes vasculares cerebrais e doenças renais (Williams, 2010). Além disso, estudos indicam uma associação entre hipertensão arterial e dano da função reprodutiva, que se manifesta com o comprometimento da função sexual (Sesayama et al., 2003; O'Donnell et al., 2004; Spessoto et al., 2010). Dados epidemiológicos evidenciam que, no Brasil, mais de quarenta e cinco por cento dos homens possuem algum grau de disfunção erétil, revelando-se um expressivo problema de saúde pública no país (Abdo et al., 2006). Somado à hipertensão arterial, o tratamento farmacológico com determinados anti-hipertensivos, também representa um fator contributivo para disfunção sexual em pacientes hipertensos, acarretando na baixa aderência ao tratamento da hipertensão arterial (Ferrario & Levy, 2002).

Considerando que a falta de controle da hipertensão arterial pode trazer consequências graves à saúde do indivíduo e que o dano à função reprodutiva está vinculado ao decréscimo de bem-estar e prejuízo da qualidade de vida, torna-se bastante relevante investigar os mecanismos neurais e sistêmicos envolvidos no desenvolvimento da hipertensão arterial e suas repercussões sobre a função reprodutiva, objeto de estudo desta tese.

1. Angiotensina II

A angiotensina II (Ang II) é um octapeptídeo, presente em diversos sistemas do organismo, envolvido na regulação da pressão arterial, perfusão tecidual e modulação da função reprodutiva (Fitzsimons, 1980; Steele et al. 1981; Clark, 1988; Saavedra, 1992; Ganong, 1995).

Trabalhos têm evidenciado que a Ang II é produzida a partir de uma sequência de eventos bioquímicos, representados pelo sistema renina-angiotensina (SRA). Os principais elementos constituintes deste sistema abrangem o angiotensinogênio, a renina, a angiotensina I (Ang I), a enzima conversora de angiotensina (ECA) e Ang II. O processo que compõe a síntese de Ang II inicia com a liberação de renina pelas células justaglomerulares das arteríolas aferentes dos rins para a circulação. A secreção da renina ativa é estimulada, principalmente, por fatores vinculados a reduções na pressão de perfusão renal; à queda na concentração de cloreto de sódio detectada pelas células da mácula densa localizadas na porção final do segmento espesso do ramo ascendente da alça de Henle; à estimulação nervosa simpática via receptores adrenérgicos. A ação da renina na circulação é clivar o angiotensinogênio, presente em grande parte no fígado, em Ang I, um decapeptídeo inativo. Por sua vez, a ECA, abundante no endotélio vascular pulmonar e sistêmico, converte a Ang I em Ang II, um peptídeo endógeno que produz seus efeitos centrais e periféricamente no organismo (Reid et al., 1978; Dzau & Re, 1994; Ferrario, 2006).

A existência de vários sistemas renina-angiotensina (SRA) distribuídos no organismo já está bem consolidada, pois diversos estudos evidenciaram a presença de SRA localizados no sistema nervoso central (SNC), além de sistemas locais identificados em tecidos como rins, coração, adrenais, gônadas, parede arterial e hipófise (Fitzsimons, 1980; Quinlan & Phillips, 1981; Saavedra, 1992; Griendling et al., 1993; Speth et al., 1999). Sabe-se que a Ang II exerce seus efeitos através de dois subtipos de receptores, classificados farmacologicamente como receptores de Ang II do tipo 1 (AT1) e do tipo 2 (AT2) (Bumpus et al., 1991; Bottari et al., 1993). A maioria das ações atribuídas à Ang II é mediada pelos receptores AT1, os quais estão amplamente distribuídos em diversos tecidos do corpo. A ligação aos receptores AT1 causa contração da musculatura lisa vascular, preferencialmente da arteríola eferente renal, com conseqüente aumento da taxa de filtração glomerular e redução do fluxo sanguíneo renal; liberação do hormônio antidiurético (ADH) pela hipófise posterior e retenção de sódio e água pelo tubo distal; secreção de aldosterona; estimulação da atividade do sistema nervoso simpático (SNS); resposta inflamatória; inibição da liberação da renina por *feedback* negativo mediado pela ação da Ang II nas células justaglomerulares (Fitzsimons, 1980; Carey & Siragy, 2003; Saavedra, 2005). Os receptores AT2 também estão distribuídos no organismo, presentes principalmente no SNC de humanos (MacGregor et al., 1995) e, em menor expressão, nos tecidos de roedores adultos (Song et al., 1991a; Tsutsumi & Saavedra, 1991; Lenkei et al., 1997). Os efeitos atribuídos aos receptores AT2 incluem a vasodilatação, inibição do crescimento celular e melhora da função miocárdica, indicando ser um receptor contra-regulador da

ação dos receptores AT1 (Carey & Siragy, 2003; Ferrario, 2006; Barker et al., 2006; Weir, 2007).

O aumento na concentração de Ang II é um dos fatores responsáveis pela elevação da pressão arterial e manutenção da hipertensão (Volpe et al., 2002; Ferrario, 2006). Periféricamente, os altos níveis de pressão arterial, mediados pelo estímulo dos receptores AT1, criam trauma mecânico nos vasos e resistência à circulação sanguínea, resultando em áreas de turbulência. Esses danos, se recorrentes, promovem um processo de remodelação e reestruturação tecidual, alterando a conformação normal dos vasos sanguíneos. Nesse sentido, a ação proliferativa vascular inibe a função endotelial e estimula mediadores do processo de fibrose tecidual levando a alterações vasculares, que comprometem a nutrição dos órgãos-alvo determinando o aparecimento de patologias isquêmicas (Weir, 2006). Outra consequência importante das altas concentrações de Ang II vinculada à ativação dos receptores AT1 é a produção elevada de espécies reativas de oxigênio, causando estresse oxidativo (Griendling et al., 1994; Berry et al., 2000; Dantas et al., 2004; Ruiz-Ortega & Ortiz, 2005). Quando as células são expostas a níveis excessivos de espécies reativas de oxigênio, pelo desequilíbrio decorrente da queda de agentes antioxidantes, ocorre estresse oxidativo (Zalba et al., 2000), condição esta que pode afetar vasos centrais e periféricos, contribuindo para patogênese da hipertensão em modelos animais e humanos (Campos & Bergamaschi, 2006; Campos, 2009; Weir, 2006).

O decréscimo na disponibilidade de óxido nítrico, um vasodilatador envolvido no relaxamento do músculo liso vascular, também tem sido relatado em ratos hipertensos e com disfunção erétil (Ushiyama et al., 2004). De fato,

existe uma associação entre dano vascular, decréscimo de óxido nítrico e aumento do estresse oxidativo na hipertensão predispondo à disfunção erétil (Dobrian et al., 2003; Ushiyama et al., 2004; Agarwal et al. 2006).

Além disso, a Ang II localizada em regiões centrais envolvidas com o controle cardiovascular também exerce seu efeito modulador sobre a pressão arterial (Ferguson et al., 2001; Katsunuma et al., 2003; Weir, 2006). Nesse sentido, há tempos foi descrita a resposta tensora neurogênica da Ang II, relacionando esta ação à estimulação do SNC pelo peptídeo (Bickerton & Buckley, 1961). Entre as ações cardiovasculares da Ang II no SNC, inclui-se a inibição do barorreflexo, via estimulação dos receptores AT1 no núcleo do trato solitário (Matsumura et al., 1998), a estimulação do SNS e a liberação de ADH (Fitzsimons, 1980). O SNC também participa do desenvolvimento e manutenção da hipertensão envolvendo a ação da Ang II periférica. O bulbo ventro-lateral rostral (RVLM) e o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) são as principais regiões relacionadas à ativação do SNS durante o desenvolvimento da hipertensão arterial (Campos & Bergamaschi, 2006). Um possível mecanismo pelo qual a Ang II circulante exerce seu efeito central é pela ligação, principalmente, aos seus receptores AT1 em neurônios especializados do encéfalo, através dos órgãos circunventriculares (OCV) (Mangiapane & Simpson, 1980; Gutman et al., 1988; Lenkei et al., 1997; Vieira et al., 2010). Sabe-se que os OCV possuem capilares fenestrados altamente permeáveis, possuindo papel importante na mediação da ação da Ang II circulante sobre o SNC. Os neurônios dessas regiões como o órgão subfornicial e órgão vascular da lâmina terminal podem ser ativados pela Ang II circulante e, então, sinalizar outras regiões envolvidas no controle

cardiovascular como o RVLM e o PVN, os quais ativam várias vias neuro-humorais (Maliszewska-Scislo et al., 2008; Campos, 2009). Assim, a ação da Ang II sobre o SNC ocorre através da passagem do peptídeo periférico pelos OCV atingindo áreas encefálicas e do peptídeo sintetizado centralmente (Bottari et al., 1993; Saavedra, 2005).

2. Modelo de Hipertensão de Goldblatt – Dois Rins e Um Clipe

O modelo de hipertensão renovascular unilateral de Goldblatt, do tipo dois rins e um clipe (2R1C), consiste na aplicação de um clipe de prata na artéria renal (Goldblatt, 1934). Nesse modelo, o clipe não promove interrupção, mas sim uma redução da perfusão renal, estimulando o aumento na síntese e liberação de renina no rim clipado. A ativação da renina culmina na produção de Ang II, desencadeando a resposta pressora (DeForrest et al., 1982; Huang et al., 1982). A interação desses efeitos contribui para o primeiro estágio da hipertensão decorrente da aplicação do modelo 2R1C, quando a atividade da renina plasmática e a concentração de Ang II circulante estão elevadas (Guan et al., 1992; Navar et al., 1998). Além disso, estudos sobre a fisiopatologia molecular do modelo 2R1C em roedores mostram que, quatro semanas depois de aplicado o clipe, as concentrações de Ang II no encéfalo apresentam-se maiores, quando comparadas ao controle sem clipe (Morishita et al., 1993). Essa elevação da Ang II no SNC parece também estar implicada na gênese da hipertensão produzida precocemente nesse modelo, desde que a injeção central do antagonista dos receptores AT1, saralasin, reduz os níveis de pressão arterial (Mann et al., 1978).

3. Função Reprodutiva

A função reprodutiva abrange mecanismos fisiológicos somáticos e comportamentais visando à preservação e ao bem-estar das espécies (Naftolin, 1981; Berne & Levy). A integridade do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG) é necessária para um processo reprodutivo eficiente, já que os sistemas nervoso e endócrino atuam coordenadamente na promoção da reprodução. O SNC é receptor e coordenador dos estímulos ambientais que influenciam a reprodução, sintetizando hormônios hipotalâmicos reguladores da liberação de hormônios hipofisários, os quais agem sobre as funções gametogênica e endócrina das gônadas. Os hormônios gonadais, além de promover o desenvolvimento e a manutenção dos caracteres sexuais, atuam sobre o encéfalo, a hipófise e a própria gônada, regulando a liberação dos seus respectivos hormônios. De fato, os hormônios sexuais são cruciais no desenvolvimento e na função do sistema reprodutivo e, também, no comportamento sexual (Naftolin, 1981; Nelson, 1995). Sendo assim, qualquer alteração no eixo HHG pode prejudicar a função reprodutiva, tanto no aspecto comportamental quanto na gametogênese. Nesse sentido, diversos estudos clínicos e de experimentação animal destacam que a hipertensão arterial é um dos fatores que pode modificar a função reprodutiva de machos (Clark, 1995; Della Chiesa et al., 2003; Sesayama, 2003).

4. Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonadal

No hipotálamo de roedores, o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) é secretado pelos neurônios da área pré-óptica medial (APOM), os

quais se projetam para a eminência mediana (EM) liberando seus produtos nos capilares do sistema porta-hipofisário até a hipófise anterior (Hiney et al., 2002). Sob o estímulo do GnRH, os gonadotrofos da hipófise anterior promovem a liberação do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo-estimulante (FSH). O LH e o FSH são importantes para o desenvolvimento e função sexual. Nos machos, o LH estimula as células de Leydig nos testículos a produzir testosterona e o FSH participa da maturação das células espermáticas no testículo (Berne & Levy, 2009). A secreção de GnRH é objeto do mecanismo de *feedback* negativo pelo aumento nos níveis plasmáticos de LH e testosterona, sendo que, nos machos, tanto o LH como o FSH possuem um perfil fisiológico de secreção em concentrações pulsáteis (Harris & Levine, 2003). Além da influência do *feedback* negativo, a secreção do GnRH é modulada pela presença de Ang II (Steele, 1992; Dornelles & Franci, 1998) e outros neurotransmissores.

Dados da literatura mostram que a retirada dos estímulos do GnRH sobre os gonadotrofos abole a síntese e secreção de LH, mantendo a produção de FSH contínua em ratos (Culler & Negro-Villar, 1986). De fato, o GnRH tem sido denominado, recentemente, também como hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH) por promover maior liberação de LH do que de FSH.

O LH controla a síntese e secreção da testosterona pelas células de Leydig via corrente sanguínea. A testosterona possui ação periférica no desencadeamento e desenvolvimento dos caracteres sexuais masculinos e, também, atua na diferenciação sexual do SNC, determinando fatores morfológicos e comportamentais específicos do macho (Babichev et al., 1990;

Bialek et al., 2004). Os efeitos centrais da testosterona são mediados, pelo menos em parte, pelos receptores androgênicos (McGinnes & Dreifuss, 1989), os quais estão localizados em áreas importantes para a regulação do comportamento sexual, como a APOM e o núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH) (Simerly et al, 1990; Harding & McGinnis, 2003).

Outro hormônio que exerce destacado efeito sobre a liberação de gonadotrofinas e a função reprodutiva é a prolactina. Este hormônio é sintetizado pela hipófise anterior, nos lactotrofos, e também em determinadas áreas hipotalâmicas. Já a prolactina de origem periférica pode agir centralmente via fluido cérebro-espinhal, através de um sistema de transporte específico mediado por receptores de prolactina no plexo coróide, havendo, também, um fluxo retrógrado deste hormônio do sistema porta hipotálamo-hipofisário (Mangurian et al., 1992; Freeman, 2000; Gill-Sharma, 2009). A dopamina, inibidor fisiológico da secreção de prolactina, é liberada pelos neurônios tuberoinfundibulares hipotalâmicos nos vasos porta-hipofisários, agindo diretamente sobre os lactotrofos da hipófise anterior para inibir a secreção de prolactina (MacLeod & Lehmeyer, 1974; Freeman et al., 2000; Gill-Sharma, 2009).

A expressão de RNAm para receptores de prolactina em áreas hipotalâmicas envolvidas na reprodução reforça as evidências da participação deste hormônio no processo reprodutivo (Kokay et al., 2011). Durante a maturação sexual de ratos, o aumento de prolactina no plasma incrementa a quantidade de receptores de LH nos testículos, exercendo efeito, também, no controle e desenvolvimento anatomofuncional das glândulas sexuais acessórias (Bartke, 1977; Bex et al., 1978). Por outro lado, o aumento crônico

da prolactina plasmática parece inibir a função reprodutiva em homens e roedores (Hermanns & Hafez, 1981; Clark, 1995; Buvat, 2003; Breigeron et al., 2007).

5. Comportamento Sexual dos Machos

O comportamento sexual dos machos é definido como todo comportamento necessário e suficiente para levar os espermatozóides até o ovócito e, para tanto, conta com a integridade dos sistemas endócrino e neural (Nelson, 1995; Agmo, 1997). Considera-se que o comportamento sexual representa a expressão da função reprodutiva do indivíduo e, de um modo geral, compreende duas fases: a apetitiva e a consumatória. A fase apetitiva representa a aproximação entre macho e fêmea e envolve todos os comportamentos utilizados pelo rato para atrair a fêmea: perseguição e cheirar genitais da fêmea, vocalizações. A fase consumatória refere-se ao período em que ocorre a cópula propriamente dita e a ejaculação (Nelson, 1995).

Nos roedores, o comportamento sexual pode ser dividido em três componentes: monta (sem intromissão), intromissão e ejaculação. Medidas do comportamento pré-copulatório do macho servem para indicar a motivação sexual. A latência da monta é o período de tempo do contato inicial entre o macho e a fêmea até a primeira monta. Assim, a motivação sexual é considerada alta se a latência da monta for curta e vice-versa (Nelson, 1995; Keaton & Clark, 1998; Chan et al., 1999). O comportamento do rato que precede a monta abrange a investigação da fêmea, quando o macho persegue, cheira a boca e região anogenital da rata (Stone, 1922). O casal emite mutuamente vocalizações ultra-sônicas em torno de 50 kHz (Hull & Dominguez,

2007). A monta ocorre quando o macho assume a posição copulatória, mas falha em inserir seu pênis na vagina da fêmea (Nelson, 1995).

A intromissão pode ser definida como a entrada do pênis na vagina durante uma monta. O macho realiza um movimento da pelve direcionando-a para frente ao contato com a fêmea. A quantificação do número de intromissões, bem como a latência da primeira intromissão também servem como medida do comportamento sexual dos machos, estando mais relacionado com o potencial erétil (Nelson, 1995; Chan et al., 1999). Embora alguns autores considerem a latência para a intromissão também vinculada ao componente motivacional (Keaton & Clark, 1998). A ejaculação é a expulsão do sêmen do corpo do macho via uretra. Em ratos, a ejaculação é comportamentalmente definida como um movimento vigoroso intravaginal, acompanhado de um arqueamento da coluna vertebral e elevação das patas dianteiras do macho antes da retirada do pênis. A latência da ejaculação é outro parâmetro comportamental que serve como medida do potencial erétil do macho (Agmo, 1997; Keaton & Clark, 1998; Chan et al., 1999). Depois da ejaculação, normalmente, os ratos permanecem um período sexualmente inativos e letárgicos, podendo até dormir. O intervalo pós-ejaculatório é o período de tempo entre uma ejaculação até a próxima intromissão (Clark, 1995; Nelson, 1995) e pode durar, em média, entre 5 a 10 minutos (Dewsbury, 1972; Clark, 1995; Hull & Dominguez, 2007).

Importante destacar que a habilidade copulatória em ratos é adquirida entre os 45 e 75 dias de idade e é dependente da testosterona (Hull & Dominguez, 2007), uma vez que a castração praticamente abole a atividade sexual e a reposição com testosterona restaura o comportamento sexual

comparando-se com o período pré-castração (Beyer et al., 1981; Clark et al., 1995).

5.1. Áreas Encefálicas que Regulam o Comportamento Sexual de Roedores

O controle do comportamento sexual envolve uma complexa rede de rotas neurais abrangendo diferentes regiões do sistema nervoso. O órgão vômero-nasal tem uma participação importante no estímulo do comportamento sexual em machos. As informações do sistema olfatório são processadas na amígdala medial (AMe) juntamente com a informação somatossensorial dos genitais e retransmitida para porção parvocelular do núcleo subparafascicular, o qual também é parte do circuito de ejaculação (Hull & Dominguez, 2007). Informações da AMe, diretamente e via núcleo do leito da estria terminal, para a APOM são essenciais para o comportamento copulatório dos ratos (Kondo & Arai, 1995). Há evidências indicando a participação indispensável da APOM no comportamento copulatório, já a AMe teria uma importância mais vinculada ao aspecto motor desse comportamento (Wood, 1997), sendo necessária a preservação dessas áreas e de suas rotas neurais para integridade do comportamento sexual (Kondo & Arai, 1995).

A APOM é fundamental para organizar o comportamento sexual do macho. Ela recebe informações sensoriais de todos os sistemas e envia de volta conexões recíprocas para essas fontes, influenciando todas as informações recebidas (Simerly & Swanson, 1986). A APOM projeta-se para núcleos do hipotálamo, mesencéfalo e tronco cerebral, os quais estão envolvidos com a regulação autonômica e somatomotora, bem como com

estados motivacionais (Simerly & Swanson, 1988). Estudos indicam que a lesão da APOM prejudica a motivação sexual dos machos em diferentes contextos, como a preferência por uma parceira do sexo feminino (Edwards & Einhorn, 1986; Paredes et al, 1998) e a perseguição da fêmea (Paredes et al, 1993). Por outro lado, a estimulação da APOM facilita o comportamento copulatório (Rodriguez-Manzo et al., 2000) e também aumenta a pressão sanguínea intracavernosa nos órgãos sexuais de machos anestesiados (Giuliano et al., 1996). Sabe-se que a APOM não se projeta diretamente para a medula espinhal, onde a ereção e emissão seminal são controladas, sendo assim, ela, provavelmente, ativa diferentes áreas que, por sua vez, provocam os reflexos (Hull & Dominguez, 2007). Nesse sentido, estudos com traçadores sugerem conexões entre a APOM, neurônios do núcleo paragigantocelular no bulbo (Murphy et al., 1999) e neurônios motores da medula espinhal (Marson & McKenna, 1996), os quais estariam envolvidos no processamento do comportamento copulatório dos machos. Dados recentes evidenciam que o núcleo paragigantocelular, o qual envia projeções bilaterais para os neurônios motores lombares e sacrais que inervam a musculatura genital, estaria envolvido nas vias descendentes inibitórias dos reflexos genitais e do comportamento copulatório, pois a lesão desse núcleo facilita a ejaculação de ratos (Normandin & Murphy, 2011).

Trabalhos revelam a participação de outras regiões centrais no processamento do comportamento sexual, como o envolvimento do núcleo ventro-medial do hipotálamo na regulação da motivação sexual do macho (Harding & McGinnis, 2003) e a atuação do PVN na mediação da função erétil (Liu et al., 1997).

6. Gônadas Masculinas e Espermatogênese

As gônadas masculinas são representadas pelos testículos. Cada testículo é envolto por uma membrana fibrosa denominada túnica albugínea e o mesênquima testicular pode ser dividido em dois compartimentos principais: o compartimento intertubular ou intersticial e o compartimento dos túbulos seminíferos. Os elementos componentes do compartimento intersticial são as células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e uma população celular variável constituída principalmente de fibroblastos e macrófagos (Setchell, 1991; Junqueira & Carneiro, 2004). O compartimento dos túbulos seminíferos ocupa a maior parte do parênquima testicular e é constituído por túnica própria, epitélio seminífero e lúmen tubular (Junqueira & Carneiro, 2004; Hess & França, 2007). A túnica própria envolve o túbulo externamente, sendo composta de células mióides peritubulares com características de células musculares lisas e propriedades contráteis. Entre a túnica própria e o epitélio seminífero existe uma membrana basal que os separa. No epitélio seminífero são encontrados dois tipos celulares: as células de Sertoli, não proliferativas, e as células germinais tronco ou espermatogônias. As células de Sertoli criam um ambiente estrutural e nutricional adequado para o desenvolvimento da espermatogônia até espermatozóide (Skinner, 1991; Junqueira & Carneiro, 2004). O lúmen tubular é a parte interna central do túbulo e está preenchido por fluido seminífero tubular e espermatozoides. O conteúdo tubular drena através dos ductos eferentes para o epidídimo, que funciona como um depósito de armazenamento e de maturação para os espermatozoides até serem levados,

pelo canal deferente e pelo ducto ejaculador, ao pênis para serem expulsos durante o ato copulatório (Berne & Levy).

A espermatogênese representa uma soma de eventos de divisão e diferenciação que ocorrem no interior dos túbulos seminíferos para a produção de espermatozóides (Johnson, 2000). Considerando-se as características morfológicas e funcionais, o processo espermatogênico pode ser dividido em três fases: a) fase proliferativa ou spermatogonial, na qual as spermatogônias passam por sucessivas e rápidas divisões mitóticas e originam spermatócitos; b) fase meiótica ou spermatocitária, quando o material genético é duplicado, recombinado e segregado, garantindo a variabilidade dentro da mesma espécie e produzem spermatídes; e c) fase de diferenciação ou spermiogênica, na qual células haplóides formadas se transformam em células altamente especializadas e estruturalmente equipadas para alcançar e fertilizar os oócitos, os espermatozóides (Berne & Levy, 2009). A spermiogênese envolve mudanças morfológicas das spermatídes até a formação do espermatozóide e esse processo é dividido em dezenove passos no rato (Leblond & Clermont 1952). Além disso, as transformações ocorridas na espermatogênese são acompanhadas por mudanças de posição das células germinais no epitélio seminífero. Assim, logo abaixo da membrana basal, localizam-se as spermatogônias circundadas pelas células de Sertoli. À medida que as spermatogônias se dividem e se diferenciam é formada uma coluna de células germinativas, a partir da membrana basal até o lúmen do túbulo, onde são liberados os espermatozóides (Leblond & Clermont 1952; Berne & Levy, 2009). Nesse sentido, atribui-se aos testículos dupla função: a gametogênese e a esteroidogênese.

7. Participação da Angiotensina II na Função Reprodutiva e suas Interações Neuroendócrinas

A regulação da função reprodutiva envolve a integração entre SNC, sistema nervoso periférico (SNP), hipófise e órgãos reprodutivos (Ganong, 1995). Diversos estudos têm mostrado que a Ang II participa da regulação do eixo HHG e da função reprodutiva de roedores (Steele, 1992; Steele et al., 1992; Ganong, 1995; Speth et al., 1999). A APOM é uma das regiões envolvidas no controle do comportamento sexual e da liberação de gonadotropinas. Essa área possui neurônios produtores de GnRH (McEwen, 1978; Hiney et al., 2002) e contém receptores de Ang II (Sirett et al., 1977; Mendelsohn et al., 1984; Dornelles & Franci, 1998), além de responder à administração ou ao bloqueio de Ang II (Dornelles and Franci, 1998). Receptores AT1 e AT2 também são encontrados na AMe (Tsutsumi & Saavedra, 1991; Mendelsohn et al., 1984; Von Bohlen und Halbach & Albrecht, 1998), outra região mediadora do comportamento sexual como descrito anteriormente. Somado a isso, há evidências de receptores de AngII nos lactotrofos e corticotrofos da adenohipófise de ratos, sugerindo-se a ação da Ang II de origem local e periférica sobre a regulação de prolactina e corticosterona (Ganong, 1993).

O efeito facilitatório da Ang II sobre a secreção do LH pode ocorrer devido sua ação direta na APOM aumentando a secreção de GnRH, já que estudos indicam aumento da atividade neuronal nessa região na presença de Ang II (Gronan & York, 1978; Dornelles & Franci, 1998). Por outro lado, existem trabalhos sugerindo que a Ang II promoveria a liberação de LH via mecanismo

indireto na APOM, com a participação do *locus coeruleus*, ou pela ação direta na hipófise anterior, ou ainda pela combinação dos dois mecanismos. No *locus coeruleus*, a Ang II promove a secreção de noradrenalina, a qual estimula os receptores alfa-adrenérgicos da APOM promovendo a liberação de GnRH (revisão: Saavedra, 1992). Na hipófise anterior, a Ang II atua no gonadotrofo aumentando a liberação de LH (Franci et al., 1990). As interações entre Ang II e LH possuem repercussões diretas sobre a síntese de testosterona (Khanum & Dufau, 1988).

A Ang II, de origem central ou periférica, é um importante regulador da secreção de prolactina apresentando uma dualidade de efeitos. Na hipófise anterior a Ang II é um potente estimulador da liberação de prolactina pelo lactotrofo (Aguilera et al., 1982; Steele et al., 1981), enquanto no SNC, por meio do núcleo arqueado, a Ang II exerce um efeito inibitório sobre a produção de prolactina (Steele et al., 1982; Jören et al., 1997; Donadio et al., 2004).

Trabalhos também têm mostrado a ação estimulatória da Ang II sobre a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), hormônio corticotrófico (CRH) e também de corticosterona (Rivier & Vale, 1983; Emeric-Sauval, 1986; Sumitomo et al., 1991). Além disso, há evidências de que as concentrações plasmáticas de corticosterona estão elevadas em ratos hipertensos (Zamir et al., 1983), o que poderia inibir a função reprodutiva desses animais. Nesse sentido, estudos mostram a participação do CRH na redução do comportamento sexual de ratos (Emeric-Sauval, 1986) e inibição da função testicular (Dufau et al., 1993).

Há dados sobre efeitos positivos do SRA testicular na esteroidogênese, espermatogênese e ejaculação (Speth et al., 1999). Por outro lado, alguns

trabalhos indicam que a Ang II central é inibitória da função sexual em ratos machos, já que sua administração via ventricular suprime a motivação sexual e a função erétil, levando a uma maior latência de cópula e do intervalo para reiniciar a monta (Keaton & Clark, 1998). Estudos do nosso laboratório mostraram que a microinjeção de Ang II na AMe reduz o comportamento sexual de machos (Breigeron et al., 2002). Ratos com 28 dias de hipertensão de origem renovascular também apresentam prejuízo do comportamento sexual (Breigeiron et al., 2007). No entanto, os mecanismos envolvidos no processo patogênico da disfunção reprodutiva decorrente da hipertensão ainda não estão definidos. Nesse sentido, nosso trabalho visa verificar o desenvolvimento das alterações na função reprodutiva em ratos submetidos a diferentes tempos de hipertensão e, assim, esclarecer os mecanismos que participam da instalação da disfunção reprodutiva.

8. Losartan

O losartan é um antagonista dos receptores AT1 que tem um potente efeito anti-hipertensivo (Chiu et al., 1990; Pals, 1993). Estudos clínicos e de experimentação animal indicam que o tratamento com losartan impede a ligação da Ang II aos receptores AT1, tendo como resposta compensatória a elevação da atividade da renina plasmática e das concentrações de Ang II circulante (Christen et al., 1991; Munafo, 1992; Tsunoda et al., 1993; Pals, 1993). Esse aumento nas concentrações plasmáticas da Ang II reflete a disponibilidade do peptídeo, o qual não se liga aos receptores AT1 para exercer seus efeitos. Quando administrado sistemicamente, o losartan parece transpor a barreira hemato-encefálica e agir no SNC (Tedesco et al., 1999),

além de sua ação periférica. Desse modo, o losartan possui o efeito de inibir a ativação do processo enzimático que compõe o SRA pelo bloqueio dos receptores AT1, favorecendo a redução da resposta hipertensora pelo impedimento da ação central e periférica da Ang II (Christen et al., 1991).

Além disso, pacientes hipertensos tratados com antagonistas dos receptores AT1 declaram melhora da função sexual com o tratamento (Della Chiesa et al., 2003), indicando a participação desses receptores na patogênese da disfunção reprodutiva.

II- JUSTIFICATIVA

Considerando as evidências clínicas e experimentais sobre a associação da hipertensão arterial com o prejuízo da função reprodutiva, nosso laboratório tem investigado os possíveis mecanismos envolvidos nessas patologias. Estudos anteriores identificaram que ratos submetidos ao modelo 2R1C possuem comprometimento do comportamento sexual e da espermatogênese após vinte e oito dias de hipertensão. Dados também revelam o vínculo da angiotensina II no processamento das respostas comportamentais durante a cópula de roedores, bem como na inibição da espermatogênese. Diante disso, o presente estudo foi desenvolvido para investigar a evolução cronológica de alterações no sistema endócrino e no comportamento sexual de ratos submetidos ao modelo 2R1C, a fim de identificar a instalação e o desenvolvimento da disfunção sexual e da infertilidade e, assim, obter evidências dos fatores neuroendócrinos envolvidos na patogênese da função reprodutiva.

III- OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Analisar os efeitos da hipertensão renovascular sobre a função reprodutiva de ratos.

2. Objetivos Específicos

- Avaliar a evolução temporal das manifestações do comportamento sexual, da gametogênese e das concentrações plasmáticas de angiotensina II, hormônio luteinizante, testosterona, prolactina e corticosterona de ratos com hipertensão renovascular.
- Avaliar os efeitos do tratamento com losartan, um antagonista dos receptores AT1, sobre as manifestações do comportamento sexual, da gametogênese e das concentrações plasmáticas de angiotensina II, hormônio luteinizante, testosterona, prolactina e corticosterona de ratos com hipertensão renovascular.

IV- MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Ratos Wistar com 90 dias de idade, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, foram mantidos em caixas plásticas com dimensões de 60 x 50 x30 cm no ratário do Laboratório de Neuroendocrinologia do Comportamento, num ambiente de temperatura (24°C a 26°C) e luz (6:00 as 18:00 h) controladas, com ração e água *ad libitum*.

Todos os experimentos envolvendo os animais foram realizados de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do *National Institutes of Health (NIH)* e tiveram a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (protocolo n° 13434).

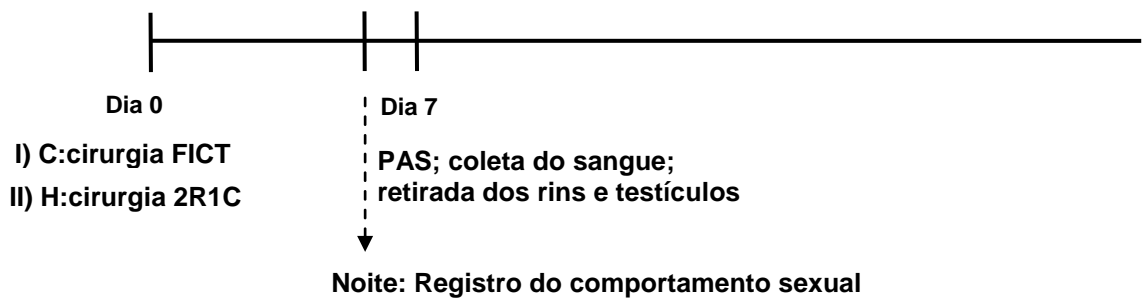
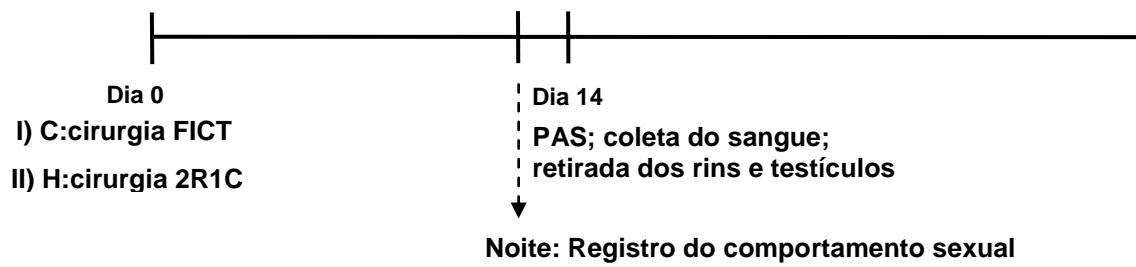
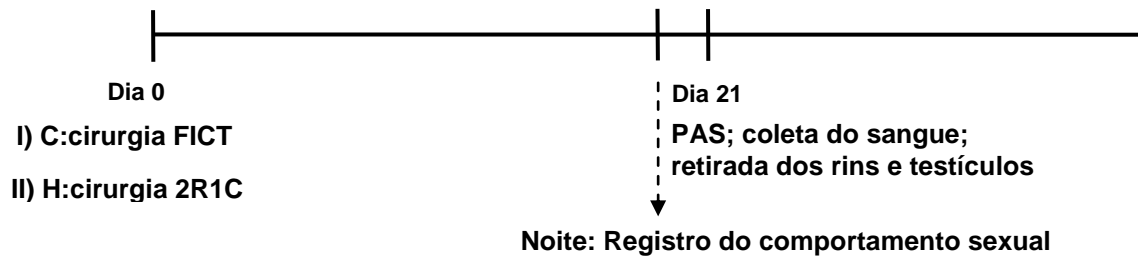
2. Desenho Experimental

2.1. Experimento 1 – Análise temporal do comportamento sexual e parâmetros endócrino-reprodutivos de ratos com hipertensão arterial induzida pelo modelo 2R1C.

Esse protocolo objetivou verificar as alterações na pressão arterial sistólica (PAS), nas concentrações plasmáticas de Ang II, LH, testosterona, prolactina e corticosterona, bem como no comportamento sexual e gametogênese, aos 7, 14, 21 e 28 dias após a colocação do clipe na artéria renal. Em cada grupo dos diferentes dias foi realizado o registro do comportamento sexual, na noite anterior à medida da PAS e coleta sanguínea. Na manhã seguinte ao registro comportamental, após 7, 14, 21 e 28 dias da cirurgia de *clipamento* ou da cirurgia fictícia, realizamos a medida da PAS. À tarde, os animais foram decapitados para a coleta do sangue e posterior dosagem dos hormônios. Também retiramos os rins para pesagem e os testículos e epidídimos foram igualmente retirados para subsequente análise da espermatogênese.

Grupos:

- I) Controles: animais pertencentes a cada grupo (quatro tempos) foram submetidos a uma cirurgia fictícia de colocação de clipe renal (FICT).
- II) Hipertensos: animais pertencentes a cada grupo (quatro tempos) foram submetidos à cirurgia de colocação de clipe na artéria renal esquerda (2R1C).

Grupo 7 dias:**Grupo 14 dias:****Grupo 21 dias:**

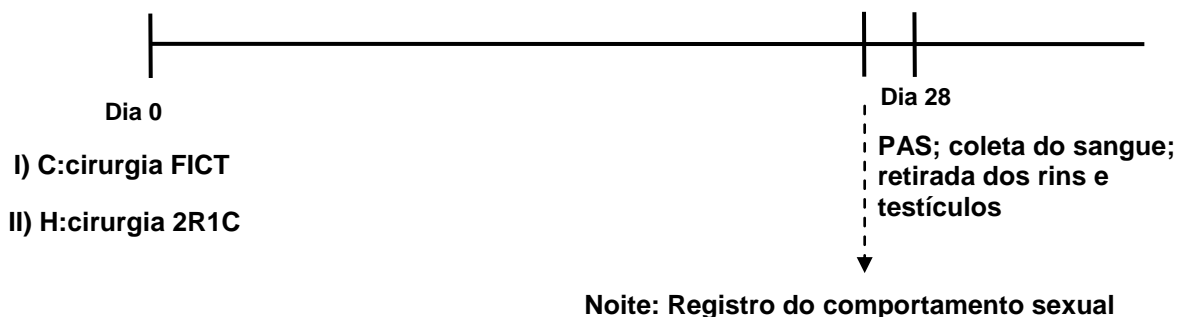
Grupo 28 dias:

Figura 1: Resumo esquemático dos grupos do Experimento 1 (C: Grupo Controle; H: Grupo Hipertenso; PAS: pressão arterial sistólica; FICT: fictícia; 2R1C: *clipamento*).

2.2. Experimento 2 – Análise dos efeitos do tratamento com o antagonista dos receptores AT1, losartan, sobre o comportamento sexual e parâmetros endócrino-reprodutivos de ratos submetidos ao modelo 2R1C.

Esse experimento objetivou verificar a ação sistêmica do losartan, um antagonista dos receptores AT1, sobre a função reprodutiva. Realizamos a medida da PAS em ratos com 7 dias de *clipamento* da artéria renal. Os animais hipertensos foram submetidos ao tratamento com losartan durante as 3 semanas seguintes. Na noite anterior a medida da PAS, registramos o

comportamento sexual dos animais. Na manhã seguinte, no 28º dia após a cirurgia de *clipamento* ou da cirurgia fictícia, foi realizada a medida da PAS e, à tarde, os animais foram mortos por decapitação para a coleta do sangue e posterior dosagem dos hormônios. Retiramos os rins para registrar o peso e os testículos-epidídimos para subsequente análise da espermatogênese.

Grupos:

- I) Cirurgia fictícia losartan (FICT+LOS): animais com 7 dias de cirurgia fictícia receberam tratamento com losartan por 21 dias.
- II) *Clipado* losartan (2R1C+LOS): animais com 7 dias de cirurgia de *clipamento* da artéria renal receberam tratamento com losartan por 21 dias.

Grupo 28 dias + Losartan:

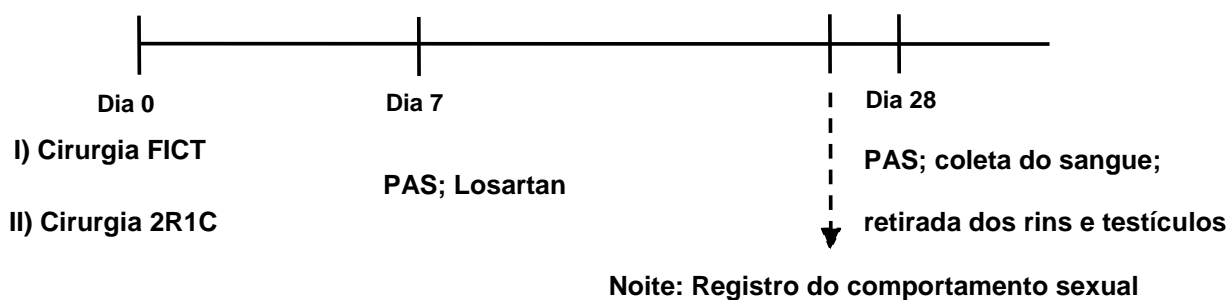


Figura 2: Resumo esquemático do Experimento 2 (PAS: pressão arterial sistólica; FICT: fictícia; 2R1C: *clipamento*).

3. Preparo das fêmeas para a experiência sexual dos machos

Ratas adultas com 90 dias de idade foram anestesiadas com injeção intraperitoneal de uma mistura de cetamina (100 mg/kg; Syntec) e xilazina (50 mg/kg; Syntec) para o procedimento cirúrgico de retiradas dos ovários, através de incisão lateral abaixo das costelas. Após duas semanas da ovariectomia, as ratas receberam injeções subcutâneas de estradiol (20 µg/0,2 mL óleo de milho; benzo-ginoestril AP, Sanofi) e progesterona (500 µg/0,2 mL óleo de milho, Sigma) para seguir o protocolo de iniciação da experiência sexual dos machos. O protocolo de reposição de hormônios foi realizado por meio de duas injeções sequenciais subcutâneas: a primeira, contendo o estradiol, aplicada 48 h antes da iniciação sexual, e a segunda, contendo a mistura de estradiol e progesterona, aplicada 6 h antes da iniciação sexual dos machos (Mas et al., 1987; Padoin et al., 2001). Cada fêmea induzida ao estro comportamental pela reposição hormonal foi testada junto a um macho sexualmente ativo e somente aquelas que apresentaram comportamento de lordose à cópula do macho foram utilizadas no protocolo comportamental (Padoin et al., 2001).

4. Iniciação da experiência sexual dos machos

Durante duas semanas, os machos foram expostos a fêmeas ovariectomizadas e induzidas ao estro comportamental pela reposição hormonal de estradiol e progesterona. Nesse período, as fêmeas receberam o protocolo de reposição hormonal por três vezes, com intervalos de 72 h, mantendo-se dois machos e uma fêmea em cada caixa. Após o período de quatorze dias, as fêmeas foram retiradas das caixas e os machos foram

mantidos em abstinência sexual por sete dias, quando, então, foram submetidos ao teste de desempenho sexual.

5. Teste de desempenho sexual

O teste de desempenho sexual de ratos, padronizado em nosso laboratório, consistiu em verificar, durante dez minutos, o comportamento sexual do macho perante uma fêmea ovariectomizada com reposição hormonal, induzida ao estro comportamental. Os machos que apresentaram seis ou mais montas com intromissão peniana, no intervalo estabelecido, foram considerados sexualmente ativos (Breigeiron et al., 2002) e, somente esses animais, foram submetidos à cirurgia de *clipamento* da artéria renal ou à cirurgia fictícia.

6. Procedimentos cirúrgicos: modelo de Goldblatt tipo I (2R1C) e cirurgia fictícia

Machos adultos, previamente anestesiados com injeção intraperitoneal de uma mistura de cetamina (100 mg/kg; Syntec) e xilazina (50 mg/kg; Syntec), foram submetidos à cirurgia para colocação do clipe de prata na artéria renal esquerda (modelo 2R1C; Nobre et al., 2006). Inicialmente, foi realizada uma incisão mediana na região abdominal com tamanho aproximado de 2 cm logo abaixo do apêndice xifóide. A abertura foi executada por planos até a cavidade peritoneal. O afastamento de vísceras abdominais foi feito com o auxílio de dois cotonetes embebidos em solução fisiológica aquecida. O rim esquerdo foi isolado em campo cirúrgico por tiras de algodão, também embebidas em soro fisiológico aquecido. Com o hilo renal identificado, iniciou-se o isolamento da

artéria renal esquerda que teve seu diâmetro reduzido pela colocação de um clipe de prata de tamanho 2 x 8 mm, dobrado em "V" e abertura interna de 0,20 mm. Os animais permaneceram com o clipe renal até o dia do experimento, conforme seu grupo experimental. Na cirurgia fictícia, realizamos os mesmos procedimentos acima descritos, com exceção da colocação do clipe na artéria renal.

7. Registro do comportamento sexual

O registro do comportamento sexual foi realizado em um período entre uma a cinco horas após o início da fase escura. Para todos os grupos, na noite anterior a medida da pressão arterial e coleta sanguínea, foi realizada a filmagem do comportamento sexual de cada rato colocado junto a uma fêmea receptiva sexualmente por indução do estro comportamental.

A descrição dos comportamentos sexuais do macho está baseada em dados da literatura (Agmo, 1997; Rhees et al., 2001; Breigeiron et al., 2007; Gil et al., 2010):

- Monta com intromissão: o macho posiciona-se atrás da fêmea e coloca suas patas dianteiras sobre a região dorsal da mesma, abrançando-a, e realiza movimento profundo de aproximação dos flancos para penetração vaginal. Em seguida, o macho se afasta rapidamente da fêmea, apresentando um movimento característico de "saída em mola", precedido do movimento rápido de abdução das patas dianteiras.
- Ejaculação: este comportamento ocorre após várias montas com e sem intromissão. A ejaculação começa com uma intromissão, mas o macho permanece sobre a fêmea durante 1-3 s após a penetração vaginal. Em

seguida, ele se afasta com movimento de saída “em mola” e fica alguns segundos em posição de congelamento com as patas abduzidas.

Os seguintes parâmetros comportamentais foram quantificados no nosso estudo:

- Latência da intromissão: período de tempo entre o início do registro, contado a partir da introdução da fêmea na caixa-observação, e a primeira monta com intromissão (penetração vaginal), analisados nos primeiros 10 min (600 s) do registro comportamental.
- Frequência da intromissão: número de intromissões realizadas nos primeiros 10 min (600 s) do registro comportamental.
- Latência da ejaculação: período de tempo da primeira intromissão até a ejaculação.

No protocolo de registro do comportamento sexual, cada macho foi retirado de sua caixa-moradia e colocado em uma caixa-observação por um período de 20 min para adaptação ao novo ambiente. A caixa-observação com dimensões de 70 x 70 x 35 cm possui paredes laterais e frontal de vidro, possibilitando a ampla visualização dos animais e o registro por filmagem de seus comportamentos. Após o período de ambientação do macho, uma fêmea induzida ao estro comportamental por reposição hormonal foi colocada junto ao macho na caixa-observação, iniciando-se a sessão de registro do comportamento sexual, com duração máxima de 30 min (1800 s) para os machos que não apresentavam comportamento ejaculatório, ou dentro deste intervalo até o comportamento ejaculatório. Assim, o término do registro ocorreu aos 30 min, quando o animal não apresentava comportamento ejaculatório, ou antes deste período logo após o comportamento ejaculatório.

Quando a ejaculação não ocorreu dentro de 30 min, considerou-se uma latência de 1800s, correspondentes ao tempo máximo de registro.

Caso o animal não realizasse intromissão nos primeiros 10 min do registro do comportamento sexual, considerou-se uma frequência de intromissão nula (=0) e latência máxima (= 600s), correspondente ao tempo de registro de 10 min.

O comportamento sexual foi registrado utilizando-se uma câmera *Sharp* e os parâmetros comportamentais foram analisados com auxílio do programa *The Observer*.

8. Medida da pressão arterial sistólica

Cada animal teve a sua pressão arterial sistólica (PAS) avaliada pelo método não invasivo de pletismografia de cauda, utilizando-se o sistema Kent Scientific (RTBP 1001 Rat Tail Blood Pressure System; Litchfield, USA). Os registros da PAS foram analisados com auxílio do programa de aquisição de dados WinDaq (DATAQ Instruments, Inc., USA).

A medida da PAS por pletismografia de cauda (*tail-cuff*) é um método indireto comprovadamente válido, possuindo correlação com o método direto de medida da pressão arterial em ratos acordados (Buñag, 1973; Widdop & Li, 1997).

Previamente ao registro, os animais foram adaptados, durante 1 h, ao ambiente da sala do laboratório de Fisiologia Cardiovascular e ao tubo de acrílico utilizado no procedimento para medida da PAS. O sistema de registro foi calibrado utilizando-se um manômetro de pressão com resolução de 1 mmHg. Durante o registro, realizado no turno da manhã, na fase clara do ciclo,

o animal foi mantido em um tubo de acrílico, com a cauda livre para colocação do esfigmomanômetro e do transdutor de pressão arterial. Cada registro teve duração média de 5 min e realizou-se a média de cinco ou seis medidas da PAS de cada animal como referência para as análises. Somente os animais *clipados* com PAS > 150 mmHg foram considerados hipertensos e incluídos no nosso estudo.

9. Coleta de sangue

Após o intervalo de, no mínimo, três horas do registro da PAS, os animais foram mortos por decapitação em guilhotina e o sangue troclear foi coletado em funis previamente heparinizados. O sangue foi centrifugado a 3000 rpm, em refrigeração a 4°C, durante vinte minutos. O plasma foi estocado em *freezer* a -70°C até as análises das concentrações hormonais.

10. Dosagens plasmáticas de Angiotensina II, Hormônio Luteinizante, Testosterona, Prolactina e Corticosterona

As concentrações plasmáticas de Ang II (ng/mL) foram dosadas pelo método de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), utilizando-se *kit Angiotensin II* – EIA (Peninsula Laboratories Inc., San Carlos, USA). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com orientações do fabricante.

As concentrações plasmáticas de LH, prolactina, testosterona e corticosterona (ng/mL) foram dosadas por técnicas de radioimunoensaio (RIE) de duplo anticorpo. Para determinar as concentrações plasmáticas de LH e prolactina foram utilizados *Kits* específicos fornecido pelo *National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive and Kidney Diseases* (NIDDK, USA). Os

anticorpos primários foram o anti-rat LH-S10 e PRL-S9, e as preparações padrões o LH-RP3 e o PRL-RP3, para as medidas do LH e da prolactina (PRL), respectivamente. Os hormônios foram iodinados com ^{125}I da NEN (Perkin Elmer) e o segundo anticorpo foi produzido em ovelhas pelo Laboratório do Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci da FMRP-USP, utilizando como inócuo gamaglobulina de coelho.

A testosterona foi extraída com éter etílico previamente ao RIE, que utilizou $[1,2,6,7]^3\text{H}$ -testosterona (New England Nuclear, USA), anticorpo específico e hormônio padrão (Sigma, USA).

Na dosagem de corticosterona, utilizou-se padrão e anticorpo específicos (Sigma, USA) e corticosterona triciada (Amersham, USA). A separação das frações livre e ligada foi realizada com a utilização de carvão-dextran. As amostras de plasma receberam adição de etanol e, em seguida, para extração de corticosterona, os tubos foram centrifugados por 15 minutos, sob refrigeração. Os sobrenadantes foram vertidos em outros tubos para o processo de liofilização e o material seco foi armazenado em *freezer* a -20°C até a realização do RIE.

Todas as amostras foram dosadas em duplicatas em um mesmo ensaio para cada hormônio. As estimativas da menor quantidade detectada foram de 0,02-0,04 ng/mL para Ang II; 0,09 ng/mL para PRL; 0,05 ng/mL para LH; 0,03 ng/mL para testosterona e 0,2 ng/mL para corticosterona.

11. Relação peso renal/peso corporal

Para estabelecer a relação entre peso renal e peso corporal, verificou-se o peso corporal dos ratos previamente à decapitação. Após a morte por decapitação e coleta sanguínea, os rins direito e esquerdo foram retirados e imediatamente pesados, sendo avaliada a relação peso renal/peso corporal x 100 para o órgão direito e esquerdo de cada rato.

12. Avaliação da espermatogênese

Após a decapitação e coleta do sangue, os animais tiveram seus testículos e epidídimos retirados, pesados, congelados em gelo seco e estocados em *freezer* a -70°C para posterior estimativa da espermatogênese pelas análises do quociente espermático e do trânsito epididimário (Mazaro & Lamano-Carvalho, 2006; Breigeiron et al., 2007). As avaliações foram realizadas no testículo e epidídimo localizados no lado direito do rato.

12.1. Quociente de espermátides (QE) e produção espermática diária (PED)

A preparação dos testículos para quantificação das espermátides envolveu a remoção da túnica albugínea, homogeneização do parênquima testicular, seguida da sonicagem em 8 mL de solução com cloreto de sódio (0,9%) e Triton X-100 (0,05%). A avaliação da quantidade de espermátides no estágio 19 da espermiogênese, resistentes à homogeneização e sonicagem, foi realizada em câmara de Neubauer, a partir de amostras de alíquotas de 100 μL do homogeneizado, que foram diluídas em 900 μL da solução salina com Triton

X-100. Para cada testículo, três amostras foram avaliadas, obtendo-se uma média das contagens que foi utilizada para quantificação. O valor encontrado da contagem das espermátides foi dividido pelo peso do parênquima testicular, obtendo-se o quociente espermático (QE) do testículo. O resultado do QE foi dividido por 6,1, que representa o número de dias das espermátides no estágio 19 permanecerem nos túbulos seminíferos (Robb et al., 1978; Mazaro et al., 2000). O resultado desta divisão é igual à produção espermática diária por testículo (PED), que também pode ser utilizada como parâmetro para avaliação da eficiência da espermatogênese (Johnson, 1995). No nosso estudo, o a PED foi utilizada para calcular o trânsito epididimário.

12.2. Trânsito epididimário (TE)

O epidídimo foi dividido em duas partes: cabeça-corpo e cauda. Cada parte foi pesada, homogeneizada e sonicada, separadamente, utilizando-se o mesmo protocolo de preparo para quantificação das espermátides nos testículos. A avaliação da quantidade de espermatozóides também foi realizada em câmara de Neubauer, a partir de amostras de alíquotas de 50 µL do homogeneizado, que foram diluídas em 950 µL da solução salina contendo Triton X-100. Para cada parte do epidídimo (cabeça-corpo e cauda) três amostras foram avaliadas, obtendo-se uma média das contagens que foi utilizada para quantificação. O valor encontrado para cada unidade foi dividido pelo peso do parênquima epididimário da respectiva unidade, obtendo-se a concentração de espermatozóides (CE) da cabeça-corpo e a CE da cauda do epidídimo. Para calcular o TE de cada unidade ao longo do ducto epididimário, o valor referente à CE foi dividido pelo respectivo valor da PED. Para o cálculo

do TE total, somou-se os valores encontrados para o TE da cabeça-corpo e da cauda do epidídimo de cada animal, fazendo-se a média dos valores calculados por grupo (Breigeiron et al., 2007).

Os seguintes cálculos foram utilizados nas quantificações:

$$\begin{array}{l} \text{- Testículos} \quad \quad \quad \text{QE} = \frac{\text{Quantidade de espermátides}}{\text{P parênquima testicular}} \quad \quad \quad \text{PED} = \frac{\text{QE}}{6,1} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} \text{- Epidídimo} \quad \quad \quad \text{CE} = \frac{\text{Quantidade de espermatozóides}}{\text{P parênquima do epidídimo}} \quad \quad \quad \text{TE} = \frac{\text{CE}}{\text{PED}} \end{array}$$

13. Tratamento com Losartan

Um grupo de ratos *clipados* por 28 dias e o seu respectivo grupo controle com cirurgia fictícia receberam tratamento com losartan, um antagonista dos receptores AT1. Os animais foram submetidos à medida da PAS no 7º dia após o procedimento cirúrgico e, dos ratos *clipados*, somente aqueles efetivamente hipertensos ($173,8 \pm 2,9$ mmHg) receberam o tratamento com losartan na água de beber, com dose de 10 mg/kg/dia já estabelecida na literatura (Nobre et al., 2006), durante os 21 dias seguintes. No decorrer do tratamento com losartan, os machos foram pesados a cada 48 horas para o reajuste da dose de losartan na solução administrada. A solução foi trocada a cada 24 horas, às 13 horas da tarde, de acordo com a curva de ingesta hídrica diária pré-estabelecida, e foram mantidos dois animais em cada caixa.

Previamente, durante 28 dias, realizamos a padronização da curva de ingestão hídrica diária de ratos *clipados* (n=7) ou com cirurgia fictícia (n=7), pertencentes a um grupo experimental adicional, visando à administração do losartan na água de beber. Neste experimento, encontramos uma variabilidade no consumo diário de água, principalmente após o procedimento cirúrgico, sendo identificado um consumo médio de $36,2 \pm 0,1$ mL/dia para o grupo com cirurgia fictícia e $39,9 \pm 0,3$ mL/ dia para o grupo *clipado* no período total analisado.

14. Análise estatística

Para os dados paramétricos (PAS, relação peso renal/peso corporal, concentrações plasmáticas hormonais, frequência das intromissões, quociente espermático e trânsito epididimário), os resultados obtidos estão expressos em média \pm EPM (erro padrão da média), sendo utilizados o teste *t-Student* ou Anova de duas vias para as análises estatísticas.

No experimento 1, os efeitos da aplicação do modelo 2R1C sobre a PAS, relação peso renal/peso corporal, gametogênese, frequência das intromissões e concentrações plasmáticas de Ang II, LH, testosterona, prolactina e corticosterona foram avaliados pelo teste t de Student para cada grupo (7, 14, 21 e 28 dias), comparando-se 2R1C vs FICT.

Os animais FICT e 2R1C (28 dias) do experimento 2, que receberam o tratamento com losartan, foram avaliados juntamente com os grupos 28 dias FICT e 2R1C do experimento 1, que receberam veículo (água), utilizando-se Anova de duas vias, seguido de pós-teste de Bonferroni, quando necessário. Desse modo, analisamos os efeitos do *clipamento* e do losartan sobre a PAS,

relação peso renal/peso corporal, gametogênese e concentrações plasmáticas de Ang II, LH, testosterona, prolactina e corticosterona.

Para os dados não paramétricos do comportamento sexual de todos os grupos (latência da intromissão e latência da ejaculação), os resultados estão expressos em mediana e intervalo interquartil (25% e 75% do período), sendo utilizado o teste *Mann-Whitney* para as análises estatísticas. A percentagem dos animais que ejacularam foi analisada pelo teste Qui-quadrado.

Os dados foram analisados com o auxílio do programa *GraphPad Prism 5* e as diferenças foram consideradas estatisticamente diferentes para $P < 0,05$.

V- RESULTADOS

1. Experimentos

1.1. Experimento 1 – Análise temporal do comportamento sexual e parâmetros endócrino-reprodutivos de ratos com hipertensão arterial induzida pelo modelo 2R1C.

1.1.1. Pressão Arterial Sistólica (PAS)

Os animais com *clipamento* da artéria renal (2R1C) apresentaram um aumento significativo na PAS, quando comparados aos seus respectivos controles com cirurgia fictícia (FICT), nos quatro grupos analisados: 7 ($171,1 \pm 3,9$; $n=13$ vs $118,9 \pm 2,4$ mmHg; $n=12$), 14 ($166,6 \pm 4,3$; $n=13$ vs $121,3 \pm 1,6$ mmHg; $n=12$), 21 ($174,8 \pm 4,6$; $n=12$ vs $119,7 \pm 2,4$ mmHg; $n=11$) e 28 dias ($176,8 \pm 6,0$; $n=13$ vs $122,9 \pm 2,6$ mmHg; $n=13$) após procedimento cirúrgico (Figura 3).

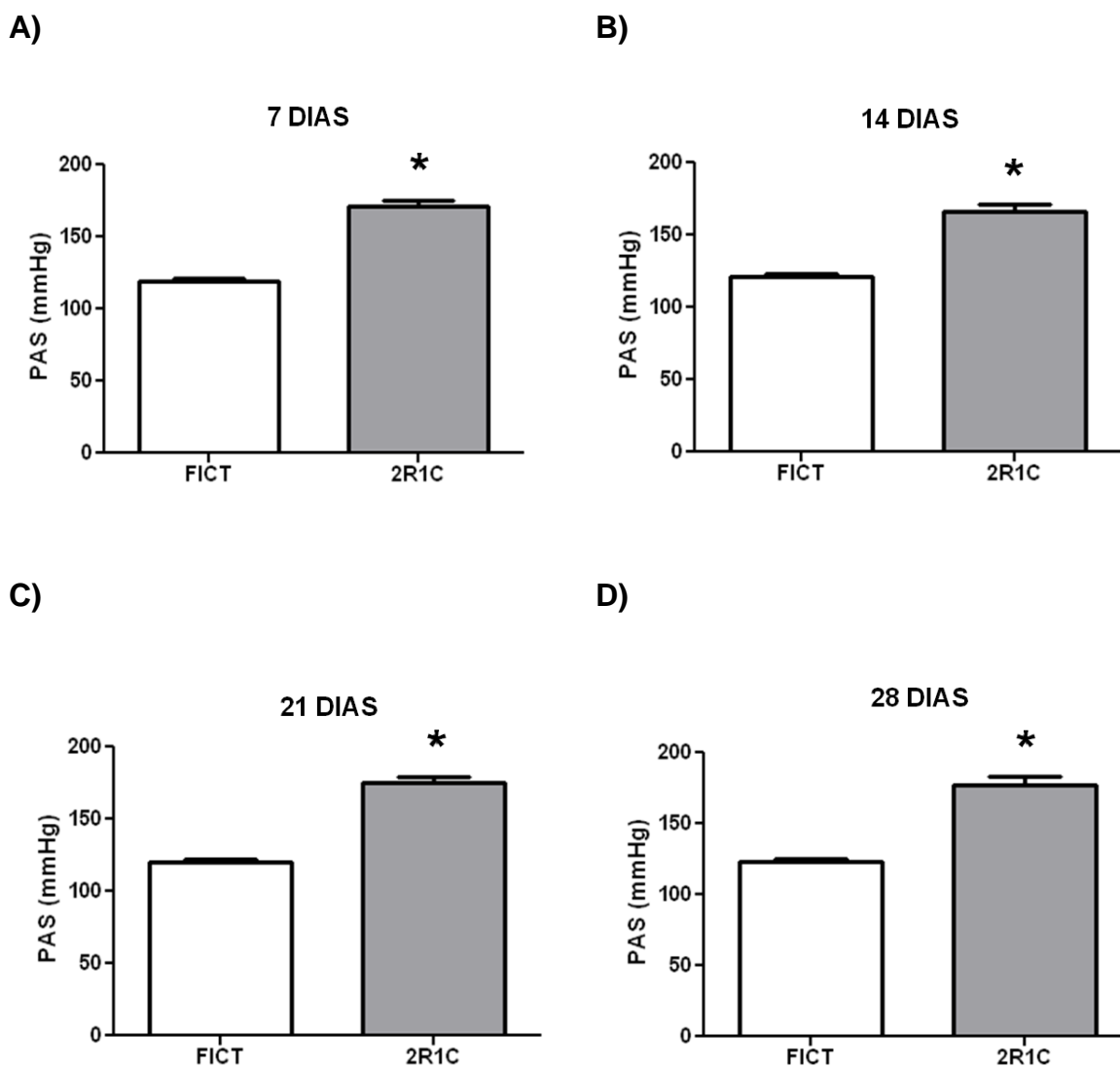


Figura 3: Alterações na pressão arterial sistólica (PAS; mmHg) de ratos submetidos à cirurgia fictícia (FICT) ou *clipamento* da artéria renal (2R1C) nos grupos A) 7 (FICT, n=12; 2R1C, n=13), B) 14 (FICT, n=12; 2R1C, n=13), C) 21 (FICT, n=11; 2R1C, n=12) e D) 28 dias (FICT, n=13; 2R1C, n=13) após procedimento cirúrgico. Em cada grupo, diferença significativa em relação ao controle (FICT) para $P < 0,05$ (*).

1.1.2. Relação peso renal/peso corporal

A Tabela 1 apresenta as relações do peso renal e peso corporal nos grupos 7, 14, 21 e 28 dias após à cirurgia fictícia ou *clipamento* da artéria renal.

Os animais com *clipamento* da artéria renal (2R1C) apresentaram uma redução significativa na relação peso renal esquerdo/peso corporal (PRE/PC; $\times 10^{-3}$ g), quando comparados à relação PRE/PC dos seus respectivos controles com cirurgia fictícia (FICT), nos grupos 14 ($0,27 \pm 0,02$; $n=9$ vs $0,32 \pm 0,01$; $n=7$), 21 ($0,22 \pm 0,03$; $n=11$ vs $0,32 \pm 0,01$; $n=8$) e 28 dias ($0,23 \pm 0,02$; $n=11$ vs $0,34 \pm 0,01$; $n=10$) após procedimento cirúrgico. Não houve alterações significativas na relação PRE/PC entre 2R1C e FICT no grupo com 7 dias de intervenção cirúrgica ($0,32 \pm 0,01$; $n=11$ vs $0,33 \pm 0,01$; $n=8$).

Os animais 2R1C apresentaram um aumento significativo na relação peso renal direito/peso corporal (PRD/PC; $\times 10^{-3}$ g), quando comparados a relação PRD/PC dos seus respectivos controles FICT, em todos os grupos analisados: 7 ($0,43 \pm 0,01$ vs $0,34 \pm 0,01$), 14 ($0,39 \pm 0,01$ vs $0,33 \pm 0,01$), 21 ($0,43 \pm 0,01$ vs $0,32 \pm 0,01$) e 28 dias ($0,43 \pm 0,02$ vs $0,35 \pm 0,01$) após procedimento cirúrgico.

Os animais 2R1C apresentaram uma redução significativa na relação PRE/PC, quando comparados a relação PRD/PC do rim contralateral, em todos os grupos analisados: 7 ($0,32 \pm 0,01$ vs $0,43 \pm 0,01$), 14 ($0,27 \pm 0,02$ vs $0,39 \pm 0,01$), 21 ($0,22 \pm 0,03$ vs $0,43 \pm 0,01$) e 28 dias ($0,23 \pm 0,02$ vs $0,43 \pm 0,02$).

Os animais FICT não apresentaram alterações significativas entre as relação PRE/PC e PRD/PC nos grupos analisados: 7 ($0,33 \pm 0,01$ vs $0,34 \pm$

0,01), 14 ($0,32 \pm 0,01$ vs $0,33 \pm 0,01$), 21 ($0,32 \pm 0,01$ vs $0,32 \pm 0,01$) e 28 dias ($0,34 \pm 0,01$ vs $0,35 \pm 0,01$).

A Figura 4 mostra o aspecto macroscópico do rim estenótico, que recebeu a aplicação do clipe, e do rim contralateral, evidenciando-se a hipotrofia do rim esquerdo após 28 dias de *clipamento* da artéria renal.

Tabela 1: Relações peso renal/peso corporal (PR/PC) de ratos submetidos à cirurgia fictícia (FICT) ou clipamento da artéria renal (2R1C) nos grupos 7 (FICT: n=8; 2R1C: n=11), 14 (FICT: n=7; 2R1C: n=9), 21 (FICT: n=8; 2R1C: n=11) e 28 dias (FICT: n=10; 2R1C: n=11) após o procedimento cirúrgico. Comparações entre ratos FICT e 2R1C para relação peso renal esquerdo/peso corporal (PRE/PC) e peso renal direito/peso corporal (PRD/PC). Comparações entre rim direito (D) e rim esquerdo (E) para relação PR/PC de ratos 2R1C e ratos FICT. Em cada grupo, diferença significativa para $P < 0,05$ (*).

Relações peso renal (PR) e peso corporal (PC)	Grupo 7 dias	Grupo 14 dias	Grupo 21 dias	Grupo 28 dias				
Relação PRE/PC FICT vs 2R1C	0.33 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.27 ± 0.02*	0.32 ± 0.01	0.22 ± 0.03*	0.34 ± 0.01	0.23 ± 0.02*	
Relação PRD/PC FICT vs 2R1C	0.34 ± 0.01	0.43 ± 0.01*	0.33 ± 0.01	0.39 ± 0.01*	0.32 ± 0.01	0.43 ± 0.01*	0.35 ± 0.01	0.43 ± 0.02*
Relação PR/PC: 2R1C Rim D vs Rim E	0.43 ± 0.01	0.32 ± 0.01*	0.39 ± 0.01	0.27 ± 0.02*	0.43 ± 0.01	0.22 ± 0.03*	0.43 ± 0.02	0.23 ± 0.02*
Relação PR/PC: FICT Rim D vs Rim E	0.34 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.34 ± 0.01

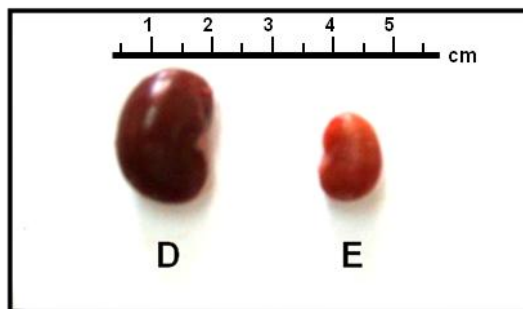


Figura 4: Aspecto macroscópico do rim esquerdo (E), estenótico, e do rim contralateral direito (D), que não recebeu aplicação do clipe, de um rato pertencente ao grupo 28 dias de *clipamento*.

1.1.3. Dosagens hormonais

1.1.3.1. Angiotensina II

Os animais com *clipamento* da artéria renal (2R1C) apresentaram um aumento significativo nas concentrações plasmáticas de Ang II (ng/mL), quando comparados aos seus respectivos controles com cirurgia fictícia (FICT), nos quatro grupos analisados: 7 ($0,79 \pm 0,11$; $n=12$ vs $0,39 \pm 0,06$ ng/ml; $n=10$), 14 ($1,25 \pm 0,26$; $n=11$ vs $0,54 \pm 0,04$ ng/ml; $n=10$), 21 ($2,4 \pm 0,82$; $n=11$ vs $0,55 \pm 0,03$ ng/ml; $n=11$) e 28 dias ($29,20 \pm 12,85$; $n=12$ vs $0,64 \pm 0,02$ ng/ml; $n=11$) após procedimento cirúrgico (Figura 5).

A diferença percentual de aumento nas concentrações plasmáticas de Ang II nos grupos 7, 14, 21 e 28 dias de 2R1C, quando comparados aos seus respectivos controles, está representada na Figura 6.

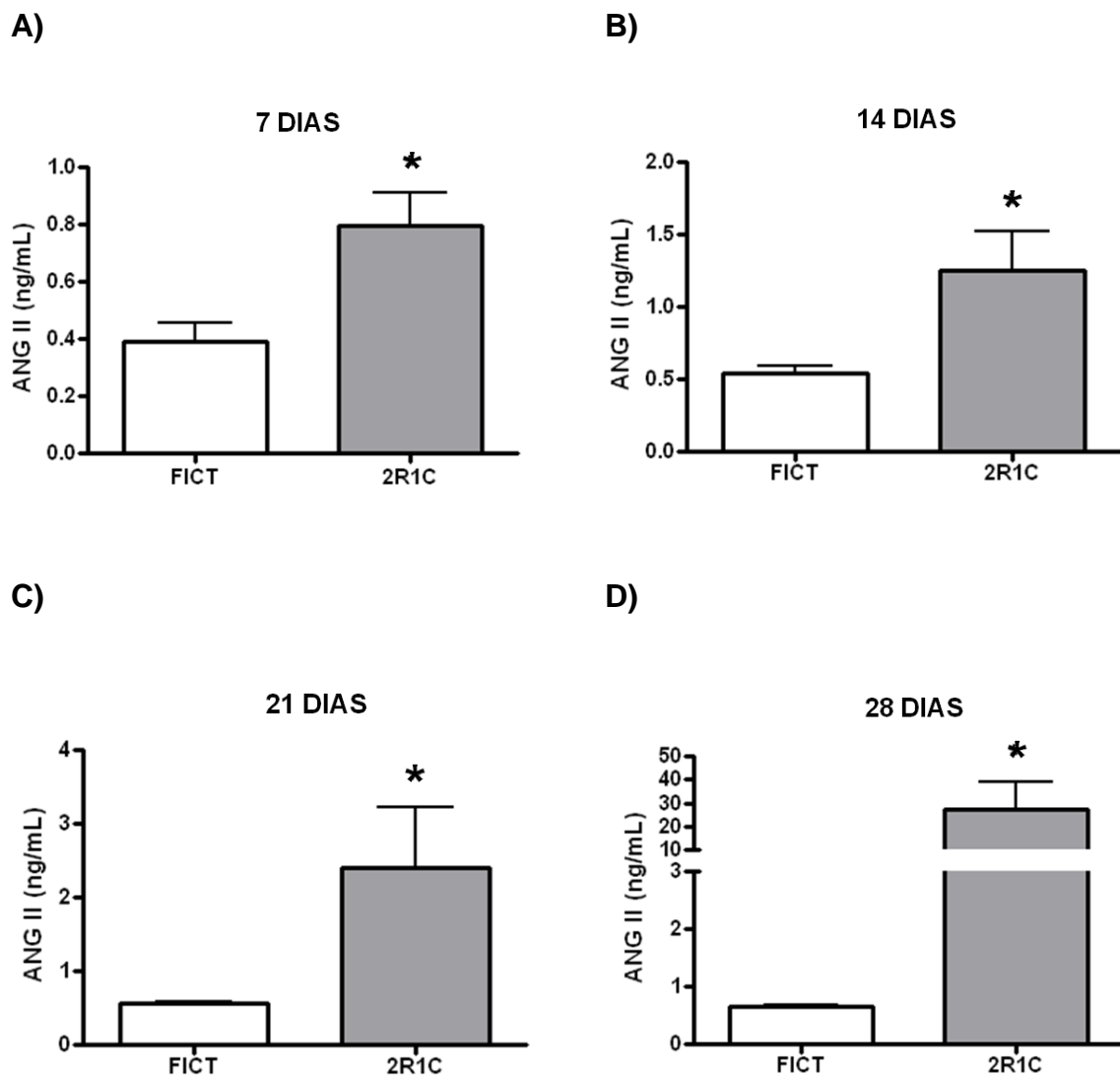


Figura 5: Concentrações plasmáticas de angiotensina II (Ang II; ng/mL) de ratos submetidos à cirurgia fictícia (FICT) ou *clipamento* da artéria renal (2R1C) nos grupos 7 (FICT, n=10; 2R1C, n=12), 14 (FICT, n=10; 2R1C, n=11), 21 (FICT, n=11; 2R1C, n=11) e 28 dias (FICT, n=11; 2R1C, n=12) após procedimento cirúrgico. Em cada grupo, diferença significativa em relação ao controle (FICT) para $P < 0,05$ (*).

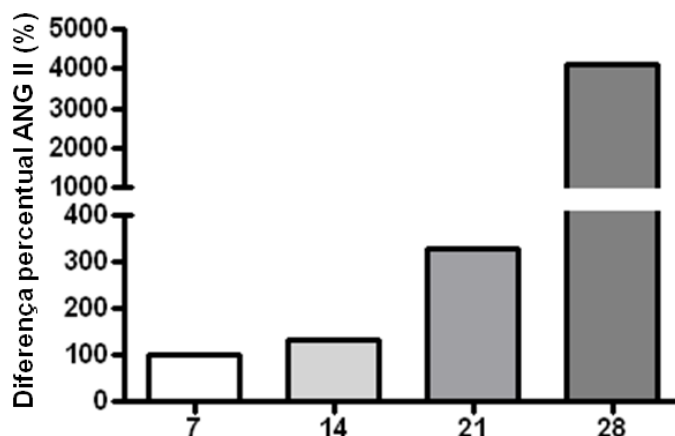


Figura 6: Diferenças percentuais (%) de aumento nas concentrações plasmáticas de angiotensina II (Ang II) nos grupos 7, 14, 21 e 28 dias após o *clipamento* da artéria renal, quando comparados aos seus respectivos controles.

1.1.3.2. Hormônio Luteinizante

Os animais com 7 dias de *clipamento* da artéria renal (2R1C) apresentaram uma redução significativa nas concentrações plasmáticas de LH (ng/mL), quando comparados aos seus respectivos controles com cirurgia fictícia [(FICT); $2,36 \pm 0,31$; n=12 vs $3,60 \pm 0,46$ ng/mL; n=12]. Os animais com 21 e 28 dias de 2R1C apresentaram um aumento significativo nas concentrações plasmáticas de LH (ng/mL), quando comparados aos seus respectivos controles FICT [21 dias: ($4,02 \pm 0,41$; n=10 vs $2,91 \pm 0,25$ ng/mL; n=12); 28 dias: ($4,20 \pm 0,58$; n=13 vs $2,70 \pm 0,21$ ng/mL; n=12)]. O grupo com 14 dias de 2R1C não apresentou diferenças significativas, quando comparado ao seu respectivo controle FICT [($4,31 \pm 0,41$; n=13 vs $3,27 \pm 0,39$ ng/mL; n=12); Figura 7].

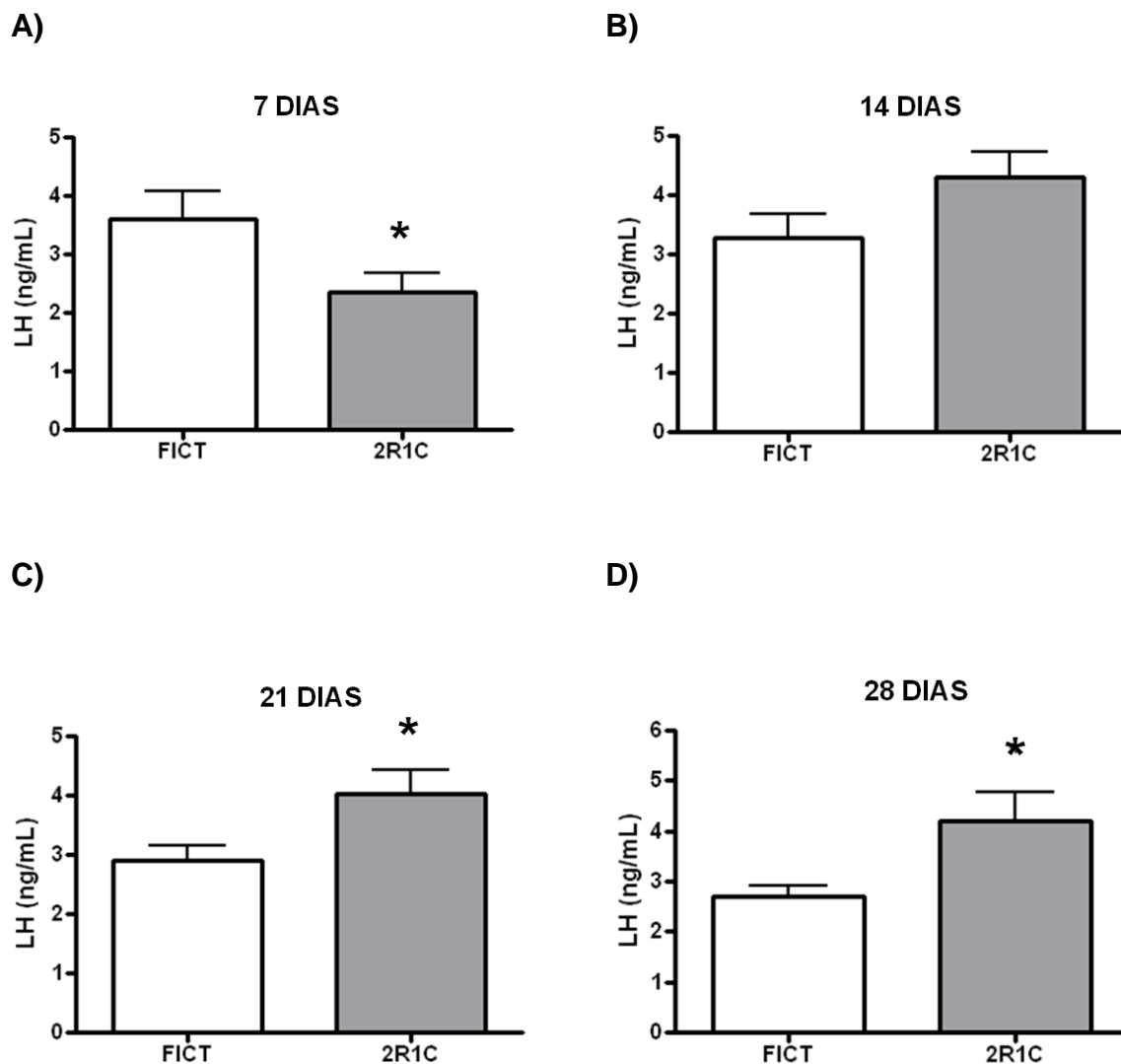


Figura 7: Concentrações plasmáticas de hormônio luteinizante (LH; ng/mL) de ratos submetidos à cirurgia fictícia (FICT) ou *clipamento* da artéria renal (2R1C) nos grupos 7 (FICT, n=12; 2R1C, n=12), 14 (FICT, n=12; 2R1C, n=13), 21 (FICT, n=10; 2R1C, n=12) e 28 dias (FICT, n=12; 2R1C, n=13) após procedimento cirúrgico. Em cada grupo, diferença significativa em relação ao controle (FICT) para $P < 0,05$ (*).

1.1.3.3. Testosterona

Os animais com 28 dias de *clipamento* da artéria renal (2R1C) apresentaram uma redução significativa nas concentrações plasmáticas de testosterona (ng/mL), quando comparados aos seus respectivos controles com cirurgia fictícia [(FICT); $0,41 \pm 0,11$; n=9 vs $0,78 \pm 0,10$ ng/mL; n=9]. Os animais com 7, 14 e 21 dias de 2R1C não apresentaram alterações significativas nas concentrações plasmáticas de testosterona (ng/mL), quando comparados aos seus respectivos controles FICT [7 dias: ($0,37 \pm 0,11$; n=10 vs $0,49 \pm 0,1$ ng/mL; n=9); 14 dias: ($0,70 \pm 0,11$; n=11 vs $0,79 \pm 0,13$ ng/mL; n=9); 21 dias: ($0,52 \pm 0,14$; n=9 vs $0,76 \pm 0,14$ ng/mL; n=8); Figura 8].

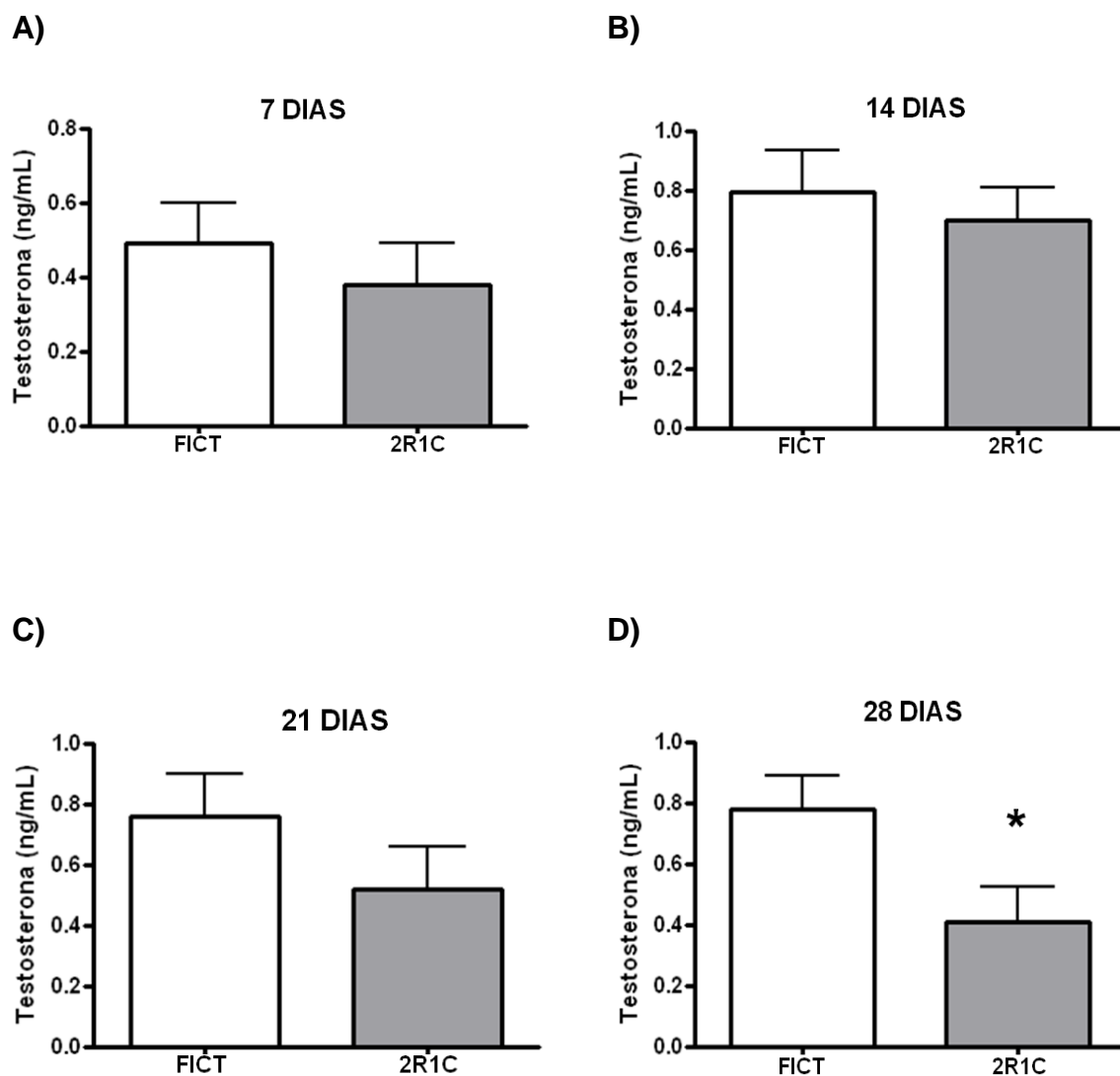


Figura 8: Concentrações plasmáticas de testosterona (ng/mL) de ratos submetidos à cirurgia fictícia (FICT) ou *clipamento* da artéria renal (2R1C) nos grupos 7 (FICT, n=9; 2R1C, n=10), 14 (FICT, n=9; 2R1C, n=11), 21 (FICT, n=8; 2R1C, n=9) e 28 dias (FICT, n=9; 2R1C, n=9) após procedimento cirúrgico. Em cada grupo, diferença significativa em relação ao controle (FICT) para $P < 0,05$ (*).

1.1.3.4. Prolactina

Os animais com 14, 21 e 28 dias de *clipamento* da artéria renal (2R1C) apresentaram um aumento significativo nas concentrações plasmáticas de prolactina (ng/mL), quando comparados aos seus respectivos controles com cirurgia fictícia [(FICT); 14 dias: ($4,75 \pm 0,36$; n=13 vs $3,28 \pm 0,32$ ng/mL; n=12); 21 dias: ($3,93 \pm 0,26$; n=9 vs $3,15 \pm 0,35$ ng/mL; n=9); 28 dias: ($4,16 \pm 0,47$; n=13 vs $2,85 \pm 0,20$ ng/mL; n=12)]. O grupo com 7 dias de 2R1C não apresentou diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de prolactina, quando comparado ao seu respectivo controle FICT [($4,74 \pm 0,74$; n=12 vs $3,87 \pm 0,37$ ng/mL; n=8); Figura 9].

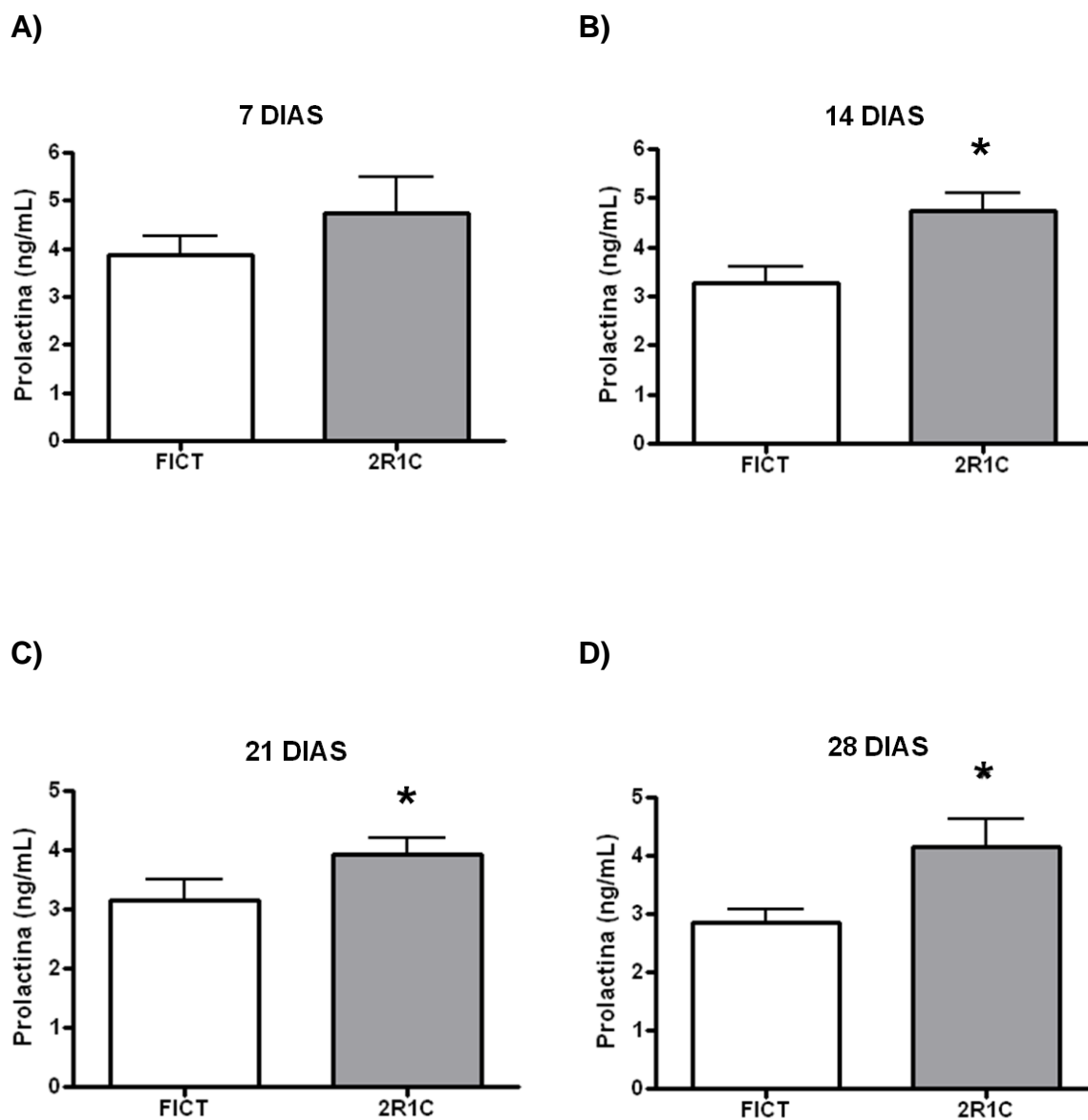


Figura 9: Concentrações plasmáticas de prolactina (ng/mL) de ratos submetidos à cirurgia fictícia (FICT) ou *clipamento* da artéria renal (2R1C) nos grupos 7 (FICT, n=8; 2R1C, n=12), 14 (FICT, n=12; 2R1C, n=13), 21 (FICT, n=9; 2R1C, n=9) e 28 dias (FICT, n=12; 2R1C, n=13) após procedimento cirúrgico. Em cada grupo, diferença significativa em relação ao controle (FICT) para $P < 0,05$ (*).

1.1.3.5. Corticosterona

Não houve alterações significativas nas concentrações plasmáticas de corticosterona (ng/mL) entre os grupos com *clipamento* da artéria renal (2R1C), quando comparados aos seus respectivos controles com cirurgia fictícia (FICT), nos quatro grupos analisados: 7 dias ($89,10 \pm 22,89$; n=12 vs $104,0 \pm 15,62$ ng/mL; n=11); 14 dias: ($92,04 \pm 8,92$; n=13 vs $89,56 \pm 14,20$ ng/mL; n=12); 21 dias: ($92,25 \pm 19,69$; n=12 vs $98,27 \pm 15,72$ ng/mL; n=11) e 28 dias ($83,17 \pm 13,87$; n=13 vs $72,75 \pm 11,62$ ng/mL; n=11) após o procedimento cirúrgico (Figura 10).

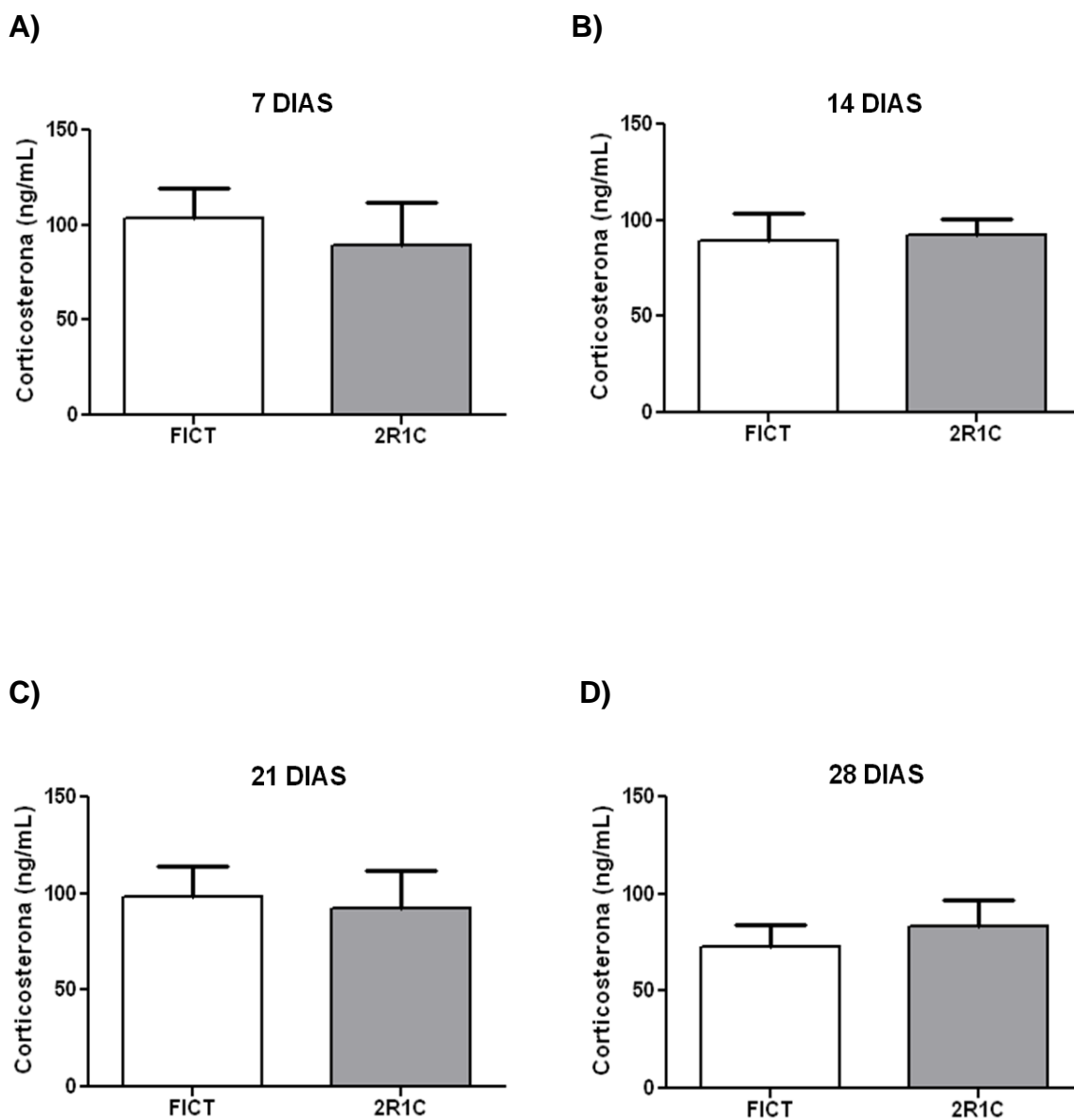


Figura 10: Concentrações plasmáticas de corticosterona (ng/mL) de ratos submetidos à cirurgia fictícia (FICT) ou *clipamento* da artéria renal (2R1C) nos grupos 7 (FICT, n=11; 2R1C, n=12), 14 (FICT, n=12; 2R1C, n=13), 21 (FICT, n=11; 2R1C, n=12) e 28 dias (FICT, n=11; 2R1C, n=13) após procedimento cirúrgico.

1.1.4. Comportamento Sexual

A Tabela 2 mostra as análises do comportamento sexual de ratos submetidos à cirurgia fictícia ou *clipamento* da artéria renal.

Os animais com *clipamento* da artéria renal (2R1C) apresentaram uma redução significativa na frequência das intromissões (n°), quando comparados aos seus respectivos controles com cirurgia fictícia (FICT), nos quatro grupos analisados: 7 ($7,23 \pm 1,11$; $n=13$ vs $11,17 \pm 0,86$; $n=12$), 14 ($4,61 \pm 0,61$; $n=13$ vs $8,16 \pm 1,06$; $n=12$), 21 ($5,41 \pm 0,99$; $n=12$ vs $10,82 \pm 1,20$; $n=11$), e 28 dias ($4,69 \pm 0,62$; $n=13$ vs $8,46 \pm 0,82$; $n=13$), após o procedimento cirúrgico.

No grupo com 7 dias de 2R1C não houve alterações significativas nos outros parâmetros comportamentais analisados, quando comparado com seu respectivo controle FICT: latência das intromissões [14,8 (8,15/24,65) vs 15,1 (11,7/19,7)], latência da ejaculações [364,8 (242,3/766,7) vs 612,6 (375,3/725,5)] e percentagem de animais que apresentaram comportamento de ejaculação (100 vs 100).

Os animais com 14, 21 e 28 dias de 2R1C apresentaram um aumento significativo na latência das intromissões (s), quando comparados aos seus respectivos controles FICT: 14 [36,4 (14,10/157,3) vs 14,5 (7,9/24,9)], 21 [60,1 (14,9/130,0) vs 13,1 (6,7/14,1)] e 28 dias [65,9 (33,25/121,5) vs 9,5 (6,15/15,45)].

Houve um aumento significativo na latência da ejaculação (s) dos animais com 14, 21 e 28 dias de 2R1C, quando comparados aos seus respectivos controles (FICT): 14 [1063,0 (762,9/1314) vs 406,0 (315,5/501,6)],

21 [990,1 (780,8/1638) vs 411,4 (256,9/575,1)] e 28 dias [1303,0 (714,7/1800) vs 351,3 (290,1/652,1)].

A porcentagem de animais que apresentaram comportamento de ejaculação foi reduzida nos grupos 2R1C, quando comparados aos seus respectivos grupos controles FICT, aos 14 (92 vs 100), 21 (83 vs 100) e 28 dias (69 vs 100) após o procedimento cirúrgico.

Tabela 2: Comportamento sexual de ratos submetidos à cirurgia fictícia (FICT) ou *clipamento* da artéria renal (2R1C) nos grupos 7 (FICT, n=12; 2R1C, n=13), 14 (FICT, n=12; 2R1C, n=13), 21 (FICT, n=11; 2R1C, n=12) e 28 dias (FICT, n=13; 2R1C, n=13) após procedimento cirúrgico. A frequência e a latência das intromissões foram obtidas em sessões de observação nos primeiros 10 min (600 s) do contato do macho com a fêmea. A latência da ejaculação foi obtida em sessões de observação de 30 min (1800 s), após a primeira monta com intromissão. Para a análise do número de animais que apresentaram comportamento de ejaculação, os dados foram expressos em porcentagem (%) e os números entre parênteses indicam os animais que apresentaram ejaculação/número total de animais do grupo. Em cada grupo, diferença significativa em relação ao controle (FICT) para $P < 0,05$ (*).

Comportamento sexual dos ratos submetidos ao modelo 2R1C ou à cirurgia fictícia.

Parâmetros	Grupo 7 dias		Grupo 14 dias		Grupo 21 dias		Grupo 28 dias	
	FICT	2R1C	FICT	2R1C	FICT	2R1C	FICT	2R1C
Frequência de intromissão (n°/600 s)	11.2±0.9	7.2±1.1*	8.2±1.1	4.6±0.6*	10.8±1.2	5.4±1.0*	8.5±0.8	4.7±0.6*
Latência de intromissão (s)	15.1 (11.7/19.7)	14.8 (8.15/24.65)	14.5 (7.9/24.9)	36.4* (14.10/157.3)	13.1 (6.7/14.1)	60.1* (14.9/130.0)	9.5 (6.15/15.45)	65.9* (33.25/121.5)
Latência de ejaculação	612.6 (375.3/725.5)	364.8 (242.3/766.7)	406.0 (315.5/501.6)	1063.0* (762.9/1314)	411.4 (256.9/575.1)	990.1* (780.8/1638)	351.3 (290.1/652.1)	1303.0* (714.7/1800)
Ratos que apresentaram comportamento de ejaculação (%)	100 (12/12)	100 (13/13)	100 (12/12)	92 (12/13)*	100 (11/11)	83 (10/12)*	100 (13/13)	69 (9/13)*

1.1.5. Espermatogênese

1.1.5.1. Quociente de Espermátides (QE)

Os animais com 21 e 28 dias de *clipamento* da artéria renal (2R1C) apresentaram uma redução significativa no QE ($n^\circ \times 10^6$), quando comparados aos seus respectivos controles com cirurgia fictícia [(FICT); 21 dias: $(183,9 \pm 8,7 \times 10^6; n=9$ vs $213,4 \pm 10,3 \times 10^6; n=8)$; 28 dias: $(164,6 \pm 6,2 \times 10^6; n=10$ vs $214,2 \pm 7,7 \times 10^6; n=10)$]. Os animais com 7 e 14 dias de 2R1C não apresentaram alterações significativas no QE, quando comparados aos seus respectivos controles FICT [7 dias: $(191,1 \pm 14,5 \times 10^6; n=8$ vs $200,1 \pm 19,28 \times 10^6; n=7)$; 14 dias: $(224,4 \pm 13,3 \times 10^6; n=7$ vs $212,8 \pm 9,5 \times 10^6; n=7)$; Figura 11].

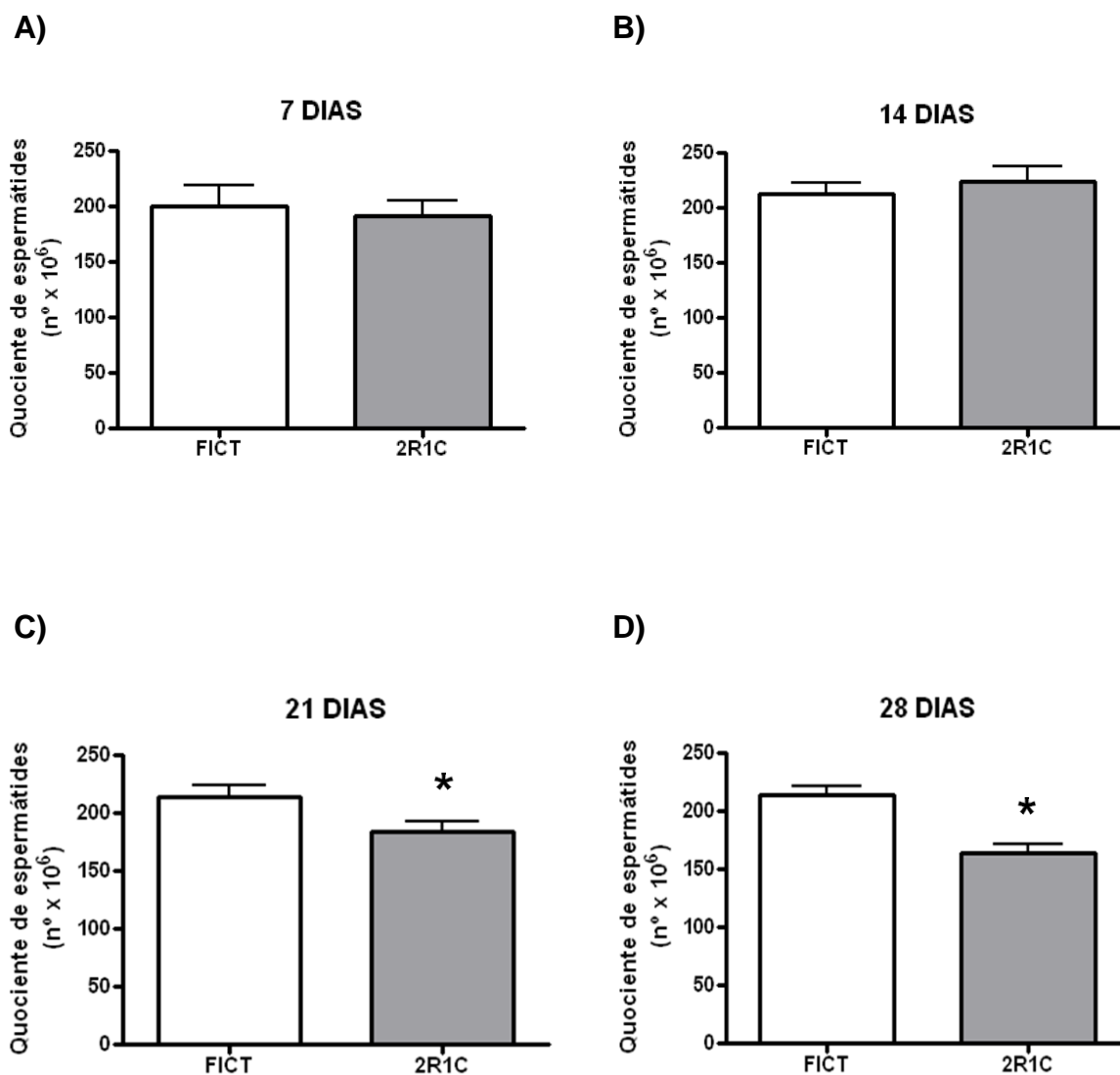


Figura 11: Quociente de espermátides (n° de espermátides/testículo; $n^\circ \times 10^6$) de ratos submetidos à cirurgia fictícia (FICT) ou *clipamento* da artéria renal (2R1C) nos grupos 7 (FICT, $n=7$; 2R1C, $n=8$), 14 (FICT, $n=7$; 2R1C, $n=7$), 21 (FICT, $n=8$; 2R1C, $n=9$) e 28 dias (FICT, $n=10$; 2R1C, $n=10$) após procedimento cirúrgico. Em cada grupo, diferença significativa em relação ao controle (FICT) para $P<0,05$ (*).

1.1.5.2. Trânsito Epididimário Total (TE)

Os animais com 21 e 28 dias de *clipamento* da artéria renal (2R1C) apresentaram um aumento significativo no TE (n° de dias), quando comparados aos seus respectivos controles com cirurgia fictícia [(FICT); 21 dias: $(8,8 \pm 0,7$ dias; $n=9$ vs $6,7 \pm 0,6$ dias; $n=8$); 28 dias: $(11,1 \pm 0,3$ dias; $n=10$ vs $6,8 \pm 0,5$ dias; $n=10$)]. Os animais com 7 e 14 dias de 2R1C não apresentaram alterações significativas no TE, quando comparados aos seus respectivos controles FICT [7 dias: $(7,6 \pm 0,7$ dias; $n=8$ vs $6,7 \pm 0,6$ dias; $n=7$); 14 dias: $(7,0 \pm 0,4$ dias; $n=7$ vs $6,7 \pm 0,3$ dias; $n=7$); Figura 12].

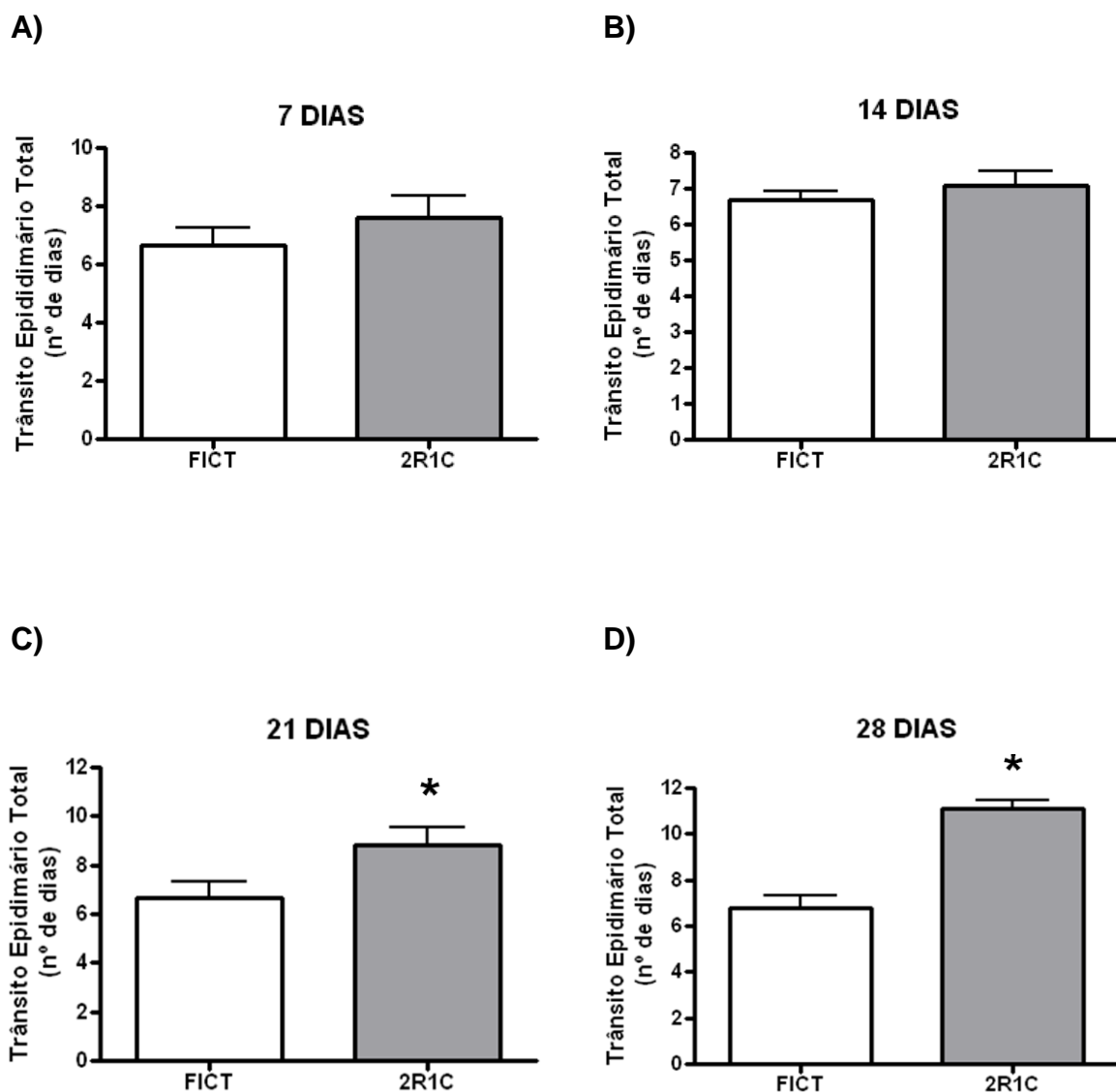


Figura 12: Trânsito epididimário total (TE; nº de dias para maturação dos espermatozoides) de ratos submetidos à cirurgia fictícia (FICT) ou ao *clipamento* da artéria renal (2R1C) nos grupos A) 7 (FICT, n=7; 2R1C, n=8), B) 14 (FICT, n=7; 2R1C, n=7), C) 21 (FICT, n=8; 2R1C, n=9) e D) 28 dias (FICT, n=10; 2R1C, n=10) após procedimento cirúrgico. Em cada grupo, diferença significativa em relação ao controle (FICT) para $P < 0,05$ (*).

1.2. Experimento 2 – Análise dos efeitos do tratamento com o antagonista dos receptores AT1, losartan, sobre o comportamento sexual e parâmetros endócrino-reprodutivos de ratos submetidos ao modelo 2R1C.

1.2.1. Pressão Arterial Sistólica (PAS)

Os animais com 28 dias de *clipamento* da artéria renal (2R1C) apresentaram um aumento significativo na PAS, quando comparados aos seus respectivos controles com cirurgia fictícia (FICT); ($176,8 \pm 6,0$; $n=13$ vs $122,9 \pm 2,6$ mmHg; $n=13$). O tratamento com losartan preveniu o aumento da PAS nos animais 2R1C; ($118,1 \pm 3,3$; $n=13$ vs $119,0 \pm 2,4$ mmHg; $n=13$); efeito do *clipamento*: $P<0,05$; efeito do losartan: $P<0,05$; interação: $P<0,05$; (Figura 13).

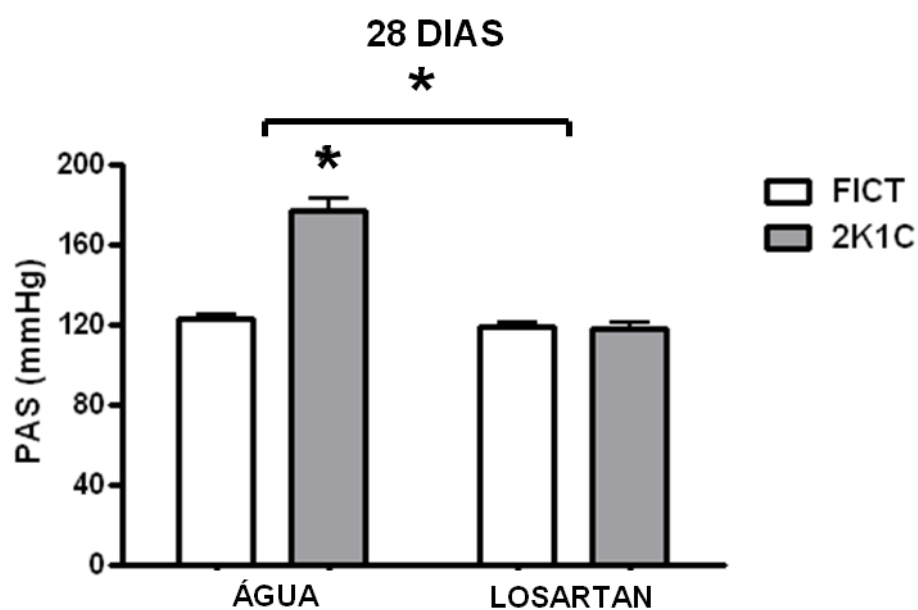


Figura 13: Alterações na pressão arterial sistólica (PAS; mmHg) após 28 dias de cirurgia fictícia (FICT) ou *clipamento* da artéria renal (2R1C) em ratos que receberam veículo (Água) ou tratamento com losartan; (FICT: n=13; 2R1C, n=13); (FICT+LOS: n=13; 2R1C+LOS: n=13). Diferença significativa para $P < 0,05$ (*); efeito do *clipamento*, efeito do losartan e interação.

1.2.2. Relação peso renal/peso corporal

A Tabela 3 apresenta as relações do peso renal e peso corporal 28 dias após à cirurgia fictícia ou *clipamento* da artéria renal em ratos que receberam veículo (água) ou tratamento com losartan.

Os animais com 28 dias de *clipamento* da artéria renal (2R1C), tratados com água ou com losartan, apresentaram uma redução significativa na relação peso renal esquerdo/peso corporal (PRE/PC; $\times 10^{-3}$ g), quando comparados a relação PRE/PC dos seus respectivos controles com cirurgia fictícia (FICT), tratados com água ou com losartan (2R1C vs FICT): (0.23 ± 0.02 ; n=11 vs 0.34 ± 0.01 ; n=10); (2R1C + LOS vs FICT+LOS): (0.15 ± 0.02 ; n=13 vs 0.34 ± 0.01 ; n= 12).

Os animais 2R1C apresentaram um aumento significativo na relação peso renal direito/peso corporal (PRD/PC; $\times 10^{-3}$ g), quando comparados a relação PRD/PC dos seus respectivos controles FICT, tratados com água ou com losartan (FICT vs 2R1C): (0.43 ± 0.02 vs 0.35 ± 0.01); (FICT+LOS vs 2R1C + LOS): (0.45 ± 0.0 vs 0.35 ± 0.01).

Os animais 2R1C apresentaram uma redução significativa na relação PRE/PC, quando comparados a relação PRD/PC do rim contralateral (2R1C+água): (0.23 ± 0.02 vs 0.43 ± 0.02); (2R1C+LOS): (0.15 ± 0.02 vs 0.45 ± 0.01).

Os animais FICT não apresentaram alterações significativas entre as relação PRE/PC e PRD/PC nos grupos analisados (2R1C+água): (0.34 ± 0.01 vs 0.35 ± 0.01); (2R1C+LOS): (0.34 ± 0.01 vs 0.35 ± 0.01).

Tabela 3: Relações peso renal/peso corporal (PR/PC) de ratos submetidos à cirurgia fictícia (FICT) ou *clipamento* da artéria renal (2R1C) nos grupos 28 dias, que receberam veículo (Grupo 28 dias); (FICT: n=12; 2R1C: n=11) e grupo 28 dias, que recebeu tratamento com losartan (Grupo 28 dias + Los); (FICT: n=12; 2R1C: n=13). Comparações entre ratos FICT e 2R1C para relação peso renal esquerdo/peso corporal (PRE/PC) e peso renal direito/peso corporal (PRD/PC). Comparações entre rim direito (D) e rim esquerdo (E) para relação PR/PC de ratos 2R1C e ratos FICT. Em cada grupo, diferença significativa para $P < 0,05$ (*).

Relações peso renal (PR) e peso corporal (PC)	Grupo 28 dias		Grupo 28 dias + Los	
Relação PRE/PC FICT vs 2R1C	0.34 ± 0.01	0.23 ± 0.02*	0.34 ± 0.01	0.15 ± 0.02*
Relação PRD/PC FICT vs 2R1C	0.35 ± 0.01	0.43 ± 0.02*	0.35 ± 0.01	0.45 ± 0.01*
Relação PR/PC: 2R1C Rim D vs Rim E	0.43 ± 0.02	0.23 ± 0.02*	0.45 ± 0.01	0.15 ± 0.02*
Relação PR/PC: FICT Rim D vs Rim E	0.35 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.34 ± 0.01

1.2.3. Dosagens hormonais

1.2.3.1. Angiotensina II

Os animais do grupo 28 dias com *clipamento* da artéria renal (2R1C), que receberam veículo (água), apresentaram um aumento significativo nas concentrações plasmáticas de Ang II (ng/mL), quando comparados aos seus respectivos controles com cirurgia fictícia (FICT); ($29,20 \pm 12,85$; $n=12$ vs $0,64 \pm 0,02$ ng/ml; $n=11$). O tratamento com losartan promoveu um aumento ainda maior nas concentrações plasmáticas de Ang II nos grupos 2R1C e FICT após 28 dias do procedimento cirúrgico (2R1C+LOS vs FICT+LOS): ($92,81 \pm 28,29$; $n=12$ vs $31,33 \pm 8,98$ ng/mL; $n=12$); efeito do *clipamento*: $P<0,05$; efeito do losartan: $P<0,05$; (Figura 14).

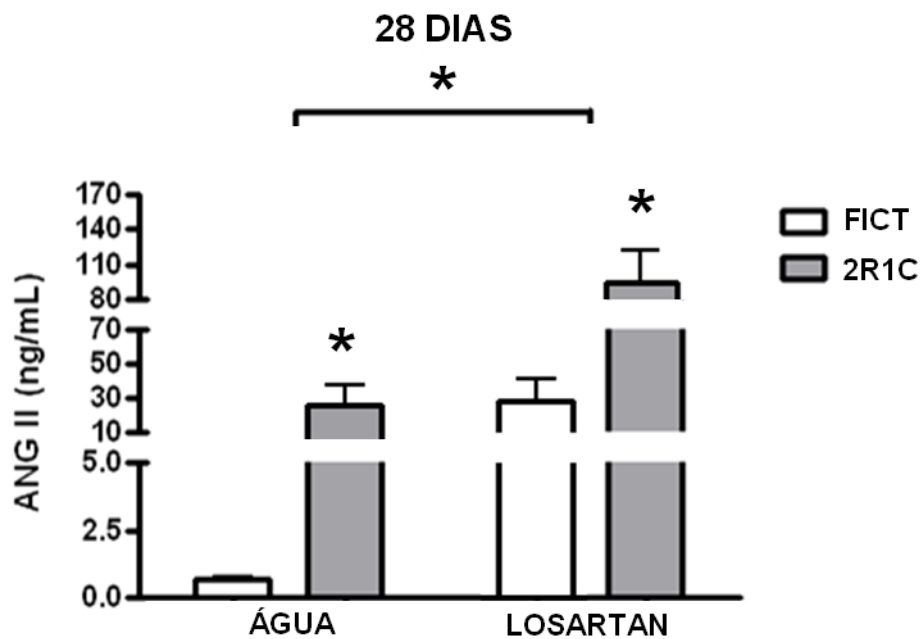


Figura 14: Concentrações plasmáticas de angiotensina II (Ang II; ng/mL) após 28 dias de cirurgia fictícia (FICT) ou *clipamento* da artéria renal (2R1C) em ratos que receberam tratamento com veículo [(ÁGUA); FICT: n=11; 2R1C: n=12] ou com losartan (FICT: n=12; 2R1C: n=12). Diferença significativa para $P < 0,05$ (*); efeitos do *clipamento* e do losartan.

1.2.3.2. Hormônio Luteinizante

Os animais do grupo 28 dias com *clipamento* da artéria renal (2R1C), que receberam veículo (água), apresentaram um aumento significativo nas concentrações plasmáticas de LH (ng/mL), quando comparados aos seus respectivos controles com cirurgia fictícia (FICT); ($4,20 \pm 0,58$; $n=13$ vs $2,70 \pm 0,21$ ng/mL; $n=12$); efeito do *clipamento*: $P<0,05$. O grupo tratado com losartan não apresentou alterações nas concentrações plasmáticas de LH (2R1C+LOS vs FICT+LOS): ($3,87 \pm 0,50$; $n=14$ vs $2,90 \pm 0,33$ ng/mL; $n=13$); (Figura 15).

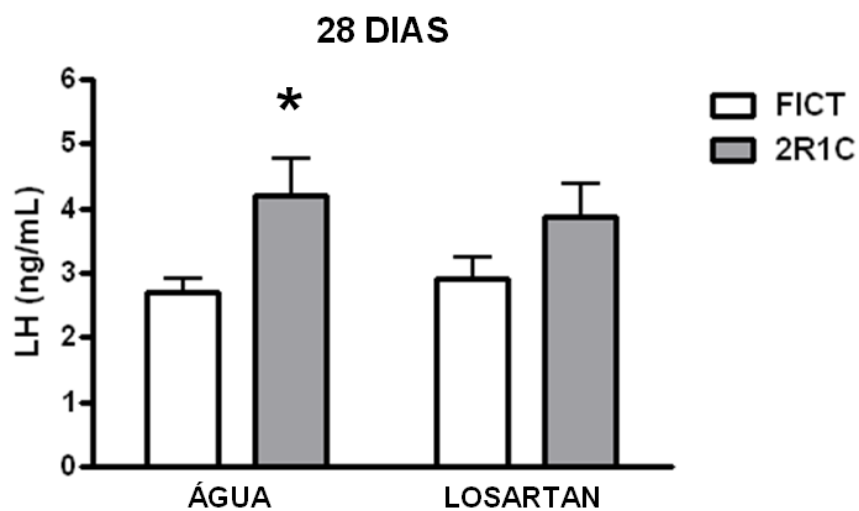


Figura 15: Concentrações plasmáticas de hormônio luteinizante (LH; ng/mL) após 28 dias de cirurgia fictícia (FICT) ou *clipamento* da artéria renal (2R1C) em ratos que receberam tratamento com veículo [(ÁGUA); FICT: $n=12$; 2R1C: $n=13$] ou com losartan (FICT: $n=13$; 2R1C: $n=14$). Diferença significativa para $P<0,05$ (*); efeito do *clipamento*.

1.2.3.3. Testosterona

Os animais com 28 dias de *clipamento* da artéria renal (2R1C), que receberam o tratamento com losartan, apresentaram um aumento significativo nas concentrações plasmáticas de testosterona (ng/mL), quando comparados aos animais 2R1C que receberam tratamento com veículo (água); (2R1C+LOS vs 2R1C+ÁGUA): ($1,35 \pm 1,01$; n=14 vs $0,41 \pm 0,34$ ng/mL, n=9); efeito do losartan: $P < 0,05$; (Figura 16).

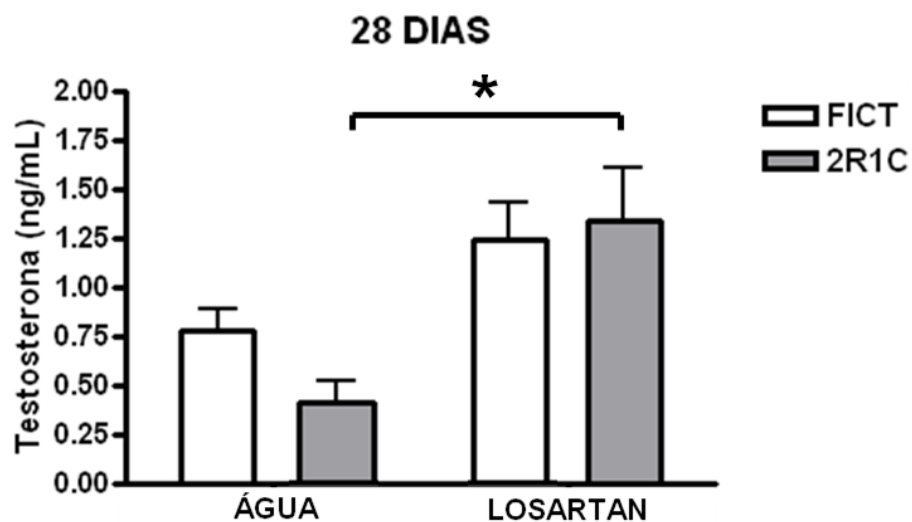


Figura 16: Concentrações plasmáticas de testosterona (ng/mL) após 28 dias de cirurgia fictícia (FICT) ou *clipamento* da artéria renal (2R1C) em ratos que receberam tratamento com veículo [(ÁGUA); FICT: n=9; 2R1C: n=9] ou com losartan (FICT: n=13; 2R1C: n=14). Diferença significativa para $P < 0,05$ (*); efeito do losartan.

1.2.3.4. Prolactina

Os animais com 28 dias de *clipamento* da artéria renal (2R1C), que receberam veículo (água), apresentaram um aumento significativo nas concentrações plasmáticas de prolactina (ng/mL), quando comparados aos seus respectivos controles com cirurgia fictícia (FICT); ($4,16 \pm 0,47$; n=13 vs $2,85 \pm 0,20$ ng/mL; n=12); efeito do *clipamento*: $P < 0,05$. O grupo tratado com losartan não apresentou alterações nas concentrações plasmáticas de prolactina ($3,79 \pm 0,29$; n=13 vs $3,26 \pm 0,29$ ng/mL; n=11); (Figura 17).

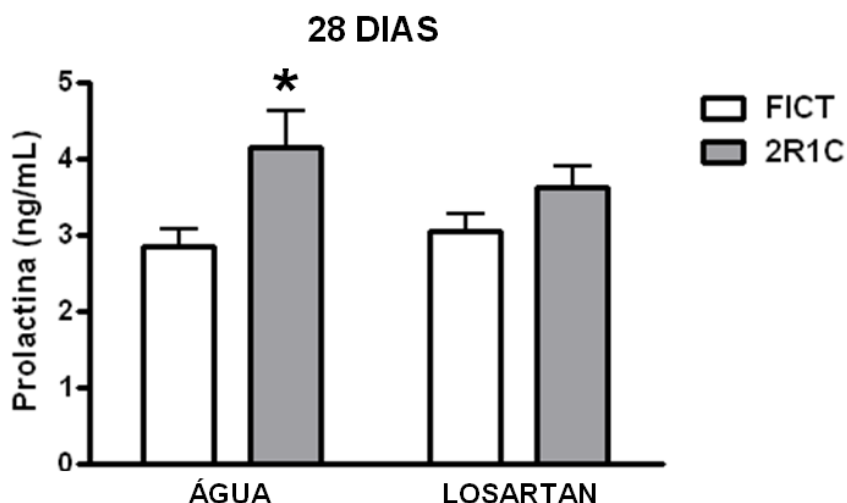


Figura 17: Concentrações plasmáticas de prolactina (ng/mL) após 28 dias de cirurgia fictícia (FICT) ou *clipamento* da artéria renal (2R1C) em ratos que receberam tratamento com veículo [(ÁGUA); FICT: n=12; 2R1C: n=13] ou com losartan (FICT: n=11; 2R1C: n=13). Diferença significativa para $P < 0,05$ (*); efeito do *clipamento*.

1.2.3.5. Corticosterona

Não houve alterações significativas nas concentrações plasmáticas de corticosterona (ng/mL) nos grupos com *clipamento* da artéria renal (2R1C) ou cirurgia fictícia, tratados com veículo (água); (2R1C vs FICT): ($83,17 \pm 13,87$; $n=13$ vs $72,75 \pm 11,62$ ng/mL; $n=11$) ou com losartan (2R1C vs FICT): ($104,88 \pm 15,95$; $n=13$ vs $100,68 \pm 12,95$ ng/mL; $n=13$); (Figura 18).

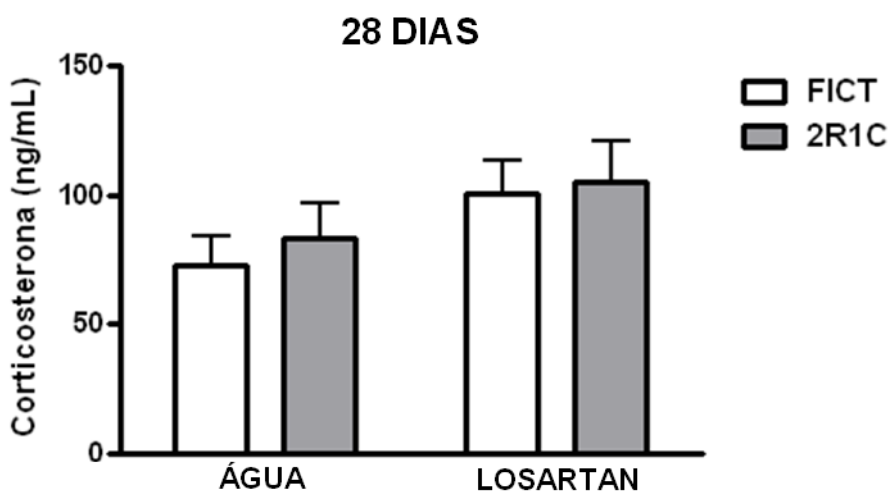


Figura 18: Concentrações plasmáticas de corticosterona (ng/mL) após 28 dias de cirurgia fictícia (FICT) ou *clipamento* da artéria renal (2R1C) em ratos que receberam tratamento com veículo (ÁGUA); (FICT: $n=11$; 2R1C: $n=13$) ou com losartan (FICT: $n=13$; 2R1C: $n=13$).

1.2.4. Comportamento Sexual

A Tabela 4 mostra as análises do comportamento sexual de ratos submetidos à cirurgia fictícia ou *clipamento* da artéria renal, que receberam tratamento com veículo ou losartan.

Os animais com 28 dias de *clipamento* da artéria renal (2R1C), que receberam veículo (água), apresentaram uma redução significativa na frequência das intromissões (n°), quando comparados aos seus respectivos controles com cirurgia fictícia (FICT); ($4,69 \pm 0,62$; $n=13$ vs $8,46 \pm 0,82$; $n=13$) e o tratamento com losartan preveniu esta alteração ($9,5 \pm 0,7$; $n=13$ vs $12,2 \pm 1,1$; $n=13$).

Os animais com 28 dias de 2R1C, que receberam veículo, apresentaram um aumento significativo na latência das intromissões (s), quando comparados aos seus respectivos controles (FICT): $65,9$ ($33,25/121,5$) vs $9,5$ ($6,15/15,45$) e o tratamento com losartan preveniu esta alteração: $17,5$ ($12,20/26,80$) vs $15,4$ ($8,51/35,72$).

Houve um aumento significativo na latência da ejaculação (s) dos animais com 28 dias de 2R1C, que receberam veículo, quando comparados aos seus respectivos controles [$1303,0$ ($714,7/1800$) vs $351,3$ ($290,1/652,1$)] e o tratamento com losartan preveniu esta alteração [$472,3$ ($292,5/704,8$) vs $572,9$ ($349,3/798,0$)].

A porcentagem de animais que apresentaram comportamento de ejaculação foi reduzida no grupo com 28 dias de 2R1C, quando comparados aos seus respectivos controles (69 vs 100) e o tratamento com losartan preveniu esta alteração (100 vs 100).

Tabela 4: Comportamento sexual após 28 dias de cirurgia fictícia (FICT) ou *clipamento* da artéria renal (2R1C) em ratos que receberam tratamento com veículo [(Grupo 28 dias); FICT: n=13; 2R1C: n=13] ou com losartan [(Grupo 28 dias + Los); FICT: n=13; 2R1C: n=13]. A frequência e a latência das intromissões foram obtidas em sessões de observação nos primeiros 10 min (600 s) do contato do macho com a fêmea. A latência da ejaculação foi obtida em sessões de observação de 30 min (1800 s), após a primeira monta com intromissão. Para a análise do número de animais que apresentaram comportamento de ejaculação, os dados foram expressos em porcentagem (%) e os números entre parênteses indicam os animais que apresentaram ejaculação/número total de animais do grupo. Em cada grupo, diferença significativa em relação ao controle (FICT) para $P < 0,05$ (*).

Comportamento sexual após 28 dias de cirurgia fictícia ou *clipamento* da artéria renal em ratos que receberam tratamento com veículo ou losartan.

Parâmetros Comportamentais	Grupo 28 dias		Grupo 28 dias + Los	
	FICT	2R1C	FICT	2R1C
Frequência de intromissão (n°/600 s)	8.5 ± 0.8	4.7 ± 0.6*	12.2 ± 1.1	9.5 ± 0.7
Latência de intromissão (s)	9.5 (6.15/15.45)	65.90* (33.25/121.5)	15.4 (8.51/35.72)	17.5 (12.20/26.80)
Latência de ejaculação	351.3 (290.1/652.1)	1303* (714.7/1800)	572.9 (349.3/798.0)	472.3 (292.5/704.8)
Ratos que apresentaram comportamento de ejaculação (%)	100 (13/13)	69 (9/13)*	100 (13/13)	100 (13/13)

1.2.5. Espermatogênese

1.2.5.1. Quociente de Espermátides (QE)

Os animais com 28 dias de *clipamento* da artéria renal (2R1C), que receberam veículo (água), apresentaram uma redução significativa no QE ($n^\circ \times 10^6$), quando comparados aos seus respectivos controles com cirurgia fictícia (FICT); ($164,6 \pm 6,2 \times 10^6$; $n=10$ vs $214,2 \pm 7,7 \times 10^6$; $n=10$); efeito do *clipamento*: $P<0,05$. O grupo tratado com losartan não apresentou alterações no QE (2R1C vs FICT): ($188,4 \pm 11,0 \times 10^6$; $n=10$ vs $211,8 \pm 9,0 \times 10^6$; $n=10$); (Figura 19).

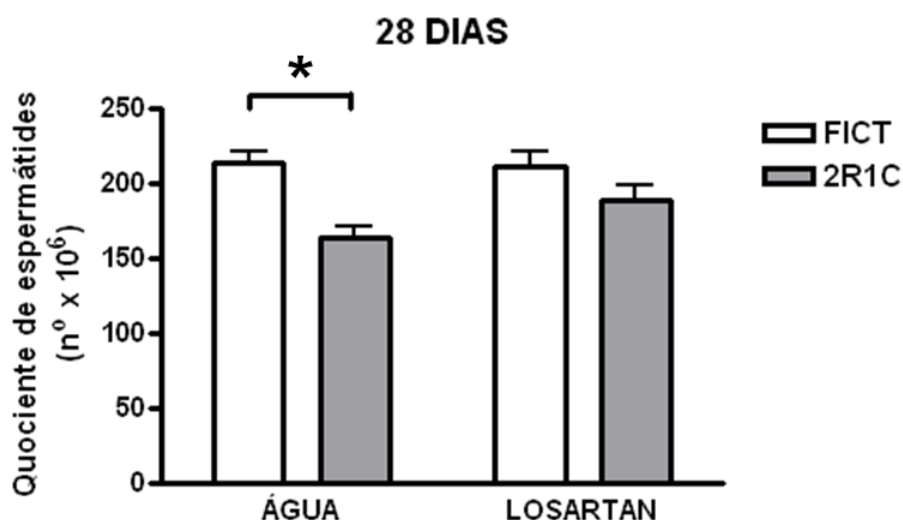


Figura 19: Quociente de espermátides (n° de espermátides/testículo; $n^\circ \times 10^6$) de ratos submetidos à cirurgia fictícia (FICT) ou *clipamento* da artéria renal (2R1C), que receberam tratamento com veículo [(ÁGUA); FICT: $n=10$; 2R1C, $n=10$] ou losartan (FICT: $n=10$; 2R1C: $n=10$). Diferença significativa para $P<0,05$ (*);efeito do *clipamento*.

1.2.5.2. Trânsito Epididimário Total (TE)

Os animais com 28 dias de *clipamento* da artéria renal (2R1C), que receberam veículo (água), apresentaram um aumento significativo no TE (nº de dias), quando comparados aos seus respectivos controles com cirurgia fictícia (FICT); ($11,1 \pm 0,3$ dias; n=10 vs $6,8 \pm 0,5$ dias; n=10) e o tratamento com losartan preveniu o aumento no TE dos animais 2R1C ($7,17 \pm 0,5$ dias; n=10 vs $7,13 \pm 0,4$ dias; n=10); efeito do *clipamento*: $P < 0,05$; efeito do losartan: $P < 0,05$; interação: $P < 0,05$; (Figura 20).

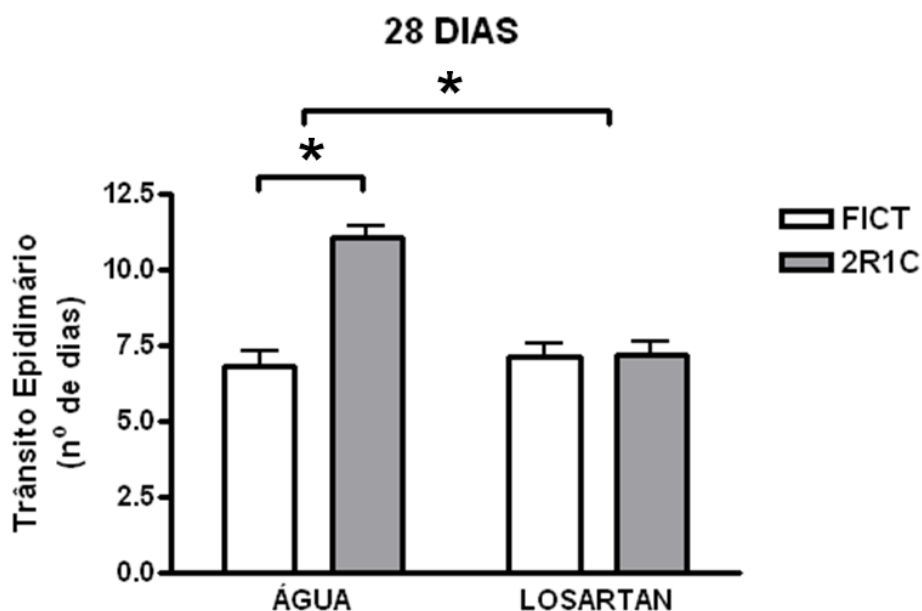


Figura 20: Trânsito epididimário total (TE; nº de dias para maturação dos espermatozóides) de ratos submetidos à cirurgia fictícia (FICT) ou ao *clipamento* da artéria renal (2R1C) tratados com veículo [(ÁGUA); FICT: n=10; 2R1C, n=10] ou com losartan (FICT: n=10; 2R1C: n=10). Diferença significativa para $P < 0,05$ (*); efeito do *clipamento*, efeito do losartan e interação.

VI- DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho mostram que a hipertensão arterial e a redução na função reprodutiva dos ratos submetidos ao *clipamento* unilateral da artéria renal (modelo 2R1C) iniciam precocemente. Os ratos dos quatro grupos analisados, aos 7, 14, 21 e 28 dias de *clipamento*, apresentaram um aumento cronologicamente progressivo nas concentrações plasmáticas de Ang II e uma resposta hipertensora, que se manteve constante nos diferentes tempos analisados. As demais análises das dosagens hormonais mostram que o emprego do modelo 2R1C promoveu redução nas concentrações plasmáticas de LH somente no grupo com 7 dias de *clipamento* e elevação nas concentrações deste hormônio aos 21 e 28 dias após o *clipamento*. As concentrações plasmáticas de prolactina aumentaram nos animais *clipados* por 14, 21 e 28 dias. Além disso, ocorreu diminuição nas concentrações plasmáticas de testosterona após 28 dias de *clipamento*. Por outro lado, não houve alterações nas concentrações plasmáticas de corticosterona dos animais submetidos ao *clipamento*. Todos os animais *clipados* manifestaram inibição de um ou mais parâmetros do comportamento sexual, ocorrendo maior comprometimento desta função com o avanço temporal da hipertensão. As análises do quociente de espermátides e do trânsito epididimário revelam um comprometimento da espermatogênese nos grupos com 21 e 28 dias de *clipamento*.

O tratamento com losartan, um antagonista dos receptores AT1, normalizou a pressão arterial e preveniu as alterações da prolactina, do LH, do comportamento sexual e da espermatogênese de ratos *clipados* por 28 dias. Somado a isso, o losartan ocasionou uma elevação nas concentrações plasmáticas de testosterona no grupo *clipado* e produziu um aumento na Ang II circulante nos grupos controle e *clipado* por 28 dias, que receberam o antagonista.

1. Ações da angiotensina II na origem e manutenção da hipertensão arterial no modelo 2R1C

A redução na pressão de perfusão renal pós-estenótica no modelo 2R1C estimula a liberação de renina, a qual induz ao aumento na formação de Ang II, resultando em elevação da pressão arterial (Pickering, 1989). Essas evidências foram confirmadas no nosso estudo, pois mostramos que os ratos com hipertensão de origem renovascular apresentam elevação nas concentrações plasmáticas de Ang II. As análises de cada grupo evidenciaram que as concentrações circulantes de Ang II aumentam progressivamente com o maior tempo de *clipamento*, apresentando elevações de 102% aos 7 dias, 131% aos 14 dias, 329% aos 21 dias e 4392% aos 28 dias após o *clipamento*. Esses aumentos na Ang II circulante caracterizam a primeira fase da hipertensão renovascular 2R1C, a qual é mais dependente do aumento na atividade da renina plasmática, induzindo a elevações na Ang II periférica (Guan et al., 1992; Nishimura et al., 1992). Dados prévios da literatura têm registrado a participação da Ang II de origem central e periférica na gênese da hipertensão nesse modelo (Mann et al., 1978; DeForrest et al., 1982; Morishita et al., 1993),

sendo identificado elevações nas concentrações de Ang II, principalmente, na circulação sanguínea e no tecido renal, como também no encéfalo de ratos hipertensos (Mann et al., 1978; Guan et al., 1992; Nishimura et al., 1992). Nesse sentido, estudos clínicos relatam um aumento na atividade da renina plasmática e nas concentrações de Ang II circulante em pacientes com hipertensão de origem renovascular (Sánchez Torres et al., 1976; Textor & Wilcox, 2001; Garovic & Textor, 2005; Hackam et al., 2007), uma patologia em humanos análoga a desencadeada pelo modelo 2R1C em roedores. Cabe destacar que pacientes com hipertensão essencial igualmente apresentam elevações nas concentrações plasmáticas de Ang II (Volpe et al., 2002; Ferrario, 2006).

Nossos resultados também mostram um aumento na PAS dos animais *clipados*, sendo que a resposta hipertensora permaneceu praticamente inalterada, independente do tempo de *clipamento*, apresentando elevações de 44% aos 7 dias, 38% aos 14 dias, 46% aos 21 dias e 44% aos 28 dias após o *clipamento*. Observamos, assim, que a elevação da PAS não acompanha o aumento progressivo nas concentrações plasmáticas de Ang II com o maior tempo de *clipamento*. Estes dados concordam com registros recentes da literatura evidenciando que camundongos submetidos ao modelo 2R1C apresentam aumento da PAS, que é mantido nos mesmos níveis pressóricos durante 1, 2, 5 e 11 semanas após o *clipamento* (Cheng et al., 2009). Outros estudos mostram um aumento progressivo da PAS até o 18º dia e uma estabilização da resposta hipertensora entre os 18º e 25º dia após o *clipamento* da artéria renal (Guan et al., 1992). É provável que fatores como as

modificações na ativação do SNS no modelo 2R1C interfiram na estabilidade da resposta hipertensora.

Estudos clínicos e experimentais identificaram que a estenose da artéria renal promove ativação do SNS (Petersson et al., 2002), além do estímulo do SRA, induzindo à elevação da pressão arterial (Hackam et al., 2007). A simpato-excitação também é encontrada em pacientes com hipertensão essencial (Fisher & Fadel, 2010) e hipertensão secundária (Neumann et al., 2007), como na doença renal crônica. O aumento na atividade simpática é, provavelmente, mediado por distúrbios dos sinais aferentes do rim sub-perfundido e/ou por aumento do estímulo nervoso em presença da Ang II e ele contribui para patogênese e manutenção da hipertensão (Mancia et al., 1999; Grisk & Rettig, 2004).

Importante destacar que os aumentos sustentados de Ang II e aldosterona levam ao remodelamento vascular e miocárdico, à disfunção endotelial, resposta inflamatória, deposição de colágeno e ativação plaquetária, devido aos efeitos da lesão hipertensiva e ativação de vias pró-fibróticas e aterosclerótica (Border & Nobel, 1998), alterações essas mediadas, principalmente, pelos receptores AT1 (Ferrario, 2006). No rim estenótico é comum ocorrer glomeruloesclerose e fibrose tubulointersticial e, no coração, a ativação da Ang II tem sido associada à hipertrofia ventricular esquerda, deposição de colágeno e fibrose do miocárdio (Border & Nobel, 1998; Tomita et al., 1998).

Nesse sentido, nossos resultados mostram uma redução no peso do rim estenótico e um aumento no peso do rim contralateral nos diferentes tempos de hipertensão analisados, corroborando dados prévios na literatura (Breigeron et

al., 2007; Cheng et al., 2009). Estudo recente em camundongos submetidos ao modelo 2R1C identificou uma redução progressiva no tamanho do rim homolateral à artéria renal *clipada* após a segunda semana da intervenção cirúrgica e, dentre as alterações histopatológicas no rim estenótico, houve fibrose intersticial progressiva, atrofia tubular, inflamação intersticial, além de uma resposta proliferativa de células epiteliais tubulares (Cheng et al., 2009). Esse mesmo trabalho evidenciou crescimento celular e aumento de volume do rim contralateral, podendo-se sugerir um mecanismo compensatório pela perda funcional do rim *clipado*.

2. Participação da angiotensina II na modulação da função reprodutiva de ratos 2R1C

Dados clínicos e experimentais têm mostrado uma associação entre hipertensão e aumento da incidência de disfunção sexual (Croog et al., 1988; Keaton & Clark, 1998; Jensen et al., 1999; Sesayama et al., 2003). Os resultados do presente estudo corroboram esses achados, pois ratos hipertensos, após 7 dias de *clipamento*, já apresentam algum comprometimento no comportamento sexual inferido pela redução na frequência das intromissões. Observamos que o aumento do tempo de hipertensão, e não uma elevação adicional de pressão sistólica, agravou o dano aos parâmetros do comportamento sexual analisados, já que ratos hipertensos, após 14, 21 e 28 dias de *clipamento*, exibem maiores latências de intromissão e de ejaculação, além da redução na frequência das intromissões. Dentre esses parâmetros comportamentais, pode-se considerar a latência de intromissão como indicador tanto da motivação sexual como da função erétil, já

a frequência de intromissões e a capacidade ejaculatória possuem correlação direta com a integridade da função erétil do rato (Keaton & Clark, 1998; Chan et al., 1999).

De fato, trabalhos prévios na literatura mostram a participação da Ang II e dos receptores AT1 na modulação do comportamento sexual de machos hipertensos (Keaton & Clark, 1998; Chan et al., 1999). No presente estudo, observamos que as concentrações plasmáticas de Ang II estão elevadas 7 dias após a aplicação do modelo 2R1C e, neste período, já ocorre uma redução na frequência das intromissões. Esta alteração se repete nos outros tempos de clampeamento, indicando um dano precoce na função erétil desses ratos. Somado a isso, nossa análise temporal permitiu verificar que as concentrações plasmáticas de Ang II e a disfunção sexual aumentam com o maior tempo de *clipamento*, pois o número de animais que não apresentaram comportamento de ejaculação aumentou progressivamente com o tempo de hipertensão. Identificando-se, assim, uma associação entre os níveis crescentes de Ang II e o agravamento do dano à função erétil dos ratos hipertensos, além do comprometimento da motivação sexual. Estudo prévio do nosso laboratório reportou que injeções de Ang II na AMe inibe o comportamento sexual de ratos, sendo este efeito prevenido pelo bloqueio dos receptores AT1 ou AT2 (Breigeron et al., 2002). Outros dados evidenciaram que ratos submetidos ao modelo 2R1C possuem um grande comprometimento do comportamento sexual aos 28 dias após o *clipamento* (Breigeron et al., 2007). Além disso, a imunorreatividade à Ang II e expressão de seus receptores AT1 e/ou AT2 estão presentes em diversas áreas centrais responsáveis pelo processamento do comportamento sexual, como a APOM e a AMe (Tsutsumi & Saavedra, 1991;

Reagan et al., 1994; Lenkei et al., 1997; Von Bohlen und Halbach & Albrecht, 1998), fortalecendo as evidências da participação da Ang II na modulação desse circuito neural (Ganong, 1995; Breigeron et al., 2002).

Uma das possibilidades que pode ser sugerida a partir dos resultados do nosso estudo é a de que altas concentrações de Ang II agem centralmente em áreas envolvidas no processamento de respostas motoras, como o trato nigroestriatal, e em regiões que controlam comportamentos motivados, incluindo a cópula, como a APOM e o sistema mesolímbico (Hull et al., 2004; 2007). Nesse sentido, trabalhos mostram que a administração central de Ang II, previamente ao contato sexual do macho com a fêmea, promove redução do comportamento copulatório do rato (Clark, 1988). Este resultado foi confirmado em um estudo posterior referindo que a infusão central de Ang II causa aumento da PAS e da ingestão de água, bem como injúria do comportamento sexual, sendo essas alterações prevenidas pelo bloqueio dos receptores AT1 via sistêmica (Keaton & Clark, 1998).

3. Participação da testosterona na modulação da função reprodutiva de ratos 2R1C

A testosterona está envolvida na regulação do comportamento sexual (Beach & Holz-Tucker, 1949), uma vez que a castração de ratos potentes sexualmente inibe a ejaculação, já a reposição exógena deste hormônio restaura o comportamento ejaculatório (Clark et al., 1995). Investigações clínicas indicam que homens hipertensos apresentam uma correlação entre redução da atividade sexual e decréscimo dos níveis plasmáticos de testosterona, havendo uma relação inversa deste hormônio com o aumento da

PAS (Fogari et al., 2002). Confirmando esses dados da literatura, nossos resultados mostram que os animais hipertensos após 28 dias de *clipamento* apresentam uma redução na testosterona circulante, quando comparados aos seus respectivos controles com cirurgia fictícia, e um maior comprometimento da função ejaculatória em relação aos outros grupos *clipados*, sugerindo-se que a redução deste hormônio contribui para o dano da função sexual. Cabe notar que os animais com 21 dias de *clipamento* também apresentam uma tendência de redução das concentrações de testosterona, o que pode estar contribuindo para o prejuízo da função erétil deste grupo. Nesse sentido, vários trabalhos indicam que a terapia com alguns anti-hipertensivos como os β -bloqueadores causa redução nos níveis de testosterona e agravamento da disfunção sexual (Suzuki et al., 1988; Fogari et al., 2002).

Estudos em ratos e camundongos evidenciam que o sistema dopaminérgico é dependente da testosterona para estimular o comportamento sexual (Scaletta & Hull, 1990; Szczypka et al., 1998). Trabalhos farmacológicos mostram que a dopamina facilita a atividade copulatória em ratos (Tagliamonte et al., 1974; Hull et al., 1986; Warner et al., 1991). Além disso, a testosterona regula os níveis de dopamina na APOM, principal local de integração das respostas do comportamento sexual. Dados mostram que as concentrações extracelulares de dopamina na APOM, em condições basais ou sob estímulo pela presença de uma fêmea, são reduzidas após a castração de ratos, quando comparados aos animais intactos (Du et al., 1998). Essa redução na concentração extracelular de dopamina na APOM, perante ausência de testosterona, parece ocorrer pela liberação inadequada de dopamina e não devido ao decréscimo na síntese deste neurotransmissor (Du et al., 1998).

Também é importante considerar que a presença de testosterona aumenta a síntese de óxido nítrico na APOM, o qual estimula a liberação de dopamina facilitando o comportamento copulatório (Hull et al., 2004).

4. Participação do hormônio luteinizante na modulação da função reprodutiva de ratos 2R1C

Nossos resultados evidenciam que os animais hipertensos com 7 dias de *clipamento* apresentam uma redução nas concentrações plasmáticas de LH, seguido de um aumento nas concentrações deste hormônio aos 21 e 28 dias após o *clipamento*. A redução inicial de LH observada neste estudo é causada, provavelmente, pela ação central da Ang II inibindo a síntese de LH, já que microinjeções intra-ventriculares de Ang II em ratos machos ou em ratas ovariectomizadas sem reposição dos esteróides ovarianos parecem reduzir os níveis plasmáticos de LH (Ganong, 1995). Sugerimos que a Ang II circulante, com elevação não muito pronunciada, como a que ocorre aos 7 dias de *clipamento*, age centralmente reduzindo os níveis de LH.

Por outro lado, dados da literatura mostram que microinjeções de Ang II na APOM causam aumento nas concentrações plasmáticas de LH em ratas em proestro ou ovariectomizadas com reposição dos hormônios ovarianos (Dornelles & Franci, 1998). Também existem evidências de que a ação central da Ang II estimula a secreção de GnRH (Steele, 1992; Ganong, 1993) e que isso se deve ao aumento da liberação de noradrenalina na porção anterior do hipotálamo. Uma hipótese é que a Ang II agiria pré-sinápticamente sobre neurônios noradrenérgicos que enviam projeções ascendentes para APOM facilitando a liberação de noradrenalina, que por sua vez estimula secreção de

GnRH nos vasos do sistema porta-hipofisial (Ganong, 1995) e, conseqüentemente, aumentaria a síntese de LH. Além disso, há evidências da localização de neurônios contendo GnRH (McEwen, 1978) e de receptores para Ang II (Tsutsumi & Saavedra, 1991) na APOM, bem como um aumento na frequência de descarga neuronal nesta área sob presença de Ang II (Gronan & York, 1978). Nessa direção, nosso trabalho mostra que ratos com hipertensão renovascular possuem altas concentrações plasmáticas de LH aos 21 e 28 dias após o *clipamento*, quando os níveis de Ang II estão mais elevados. Assim, é provável que, em situações de concentrações plasmáticas de Ang II muito elevadas, decorrente da isquemia renal, a ação da Ang II centralmente estimule a secreção de GnRH, via neurônios noradrenérgicos e/ou pela ativação dos receptores de Ang II nos neurônios que contêm GnRH, aumentando as concentrações plasmáticas de LH. Desse modo, a ação central da Ang II caracterizaria uma dualidade de efeitos dependente de concentração deste peptídeo.

Além disso, é importante considerar a ação periférica da Ang II sobre as funções do LH e a síntese de testosterona. Estudos *in vitro* evidenciam uma ação local da Ang II em inibir a capacidade do LH para estimular a produção de testosterona nas células de Leydig de ratos adultos (Khanum & Dufau, 1988). Esses dados indicam que a Ang II está envolvida no mecanismo de retroalimentação entre o LH e a produção de testosterona. Sugere-se que as concentrações elevadas de Ang II circulante nos ratos hipertensos inibem a rota do AMPc nas células de Leydig, reduzindo a capacidade de ligação do LH aos seus respectivos receptores (Khanum & Dufau, 1988) e, conseqüentemente, a síntese de testosterona. Nesse sentido, nosso estudo mostra que, apesar do

aumento nos níveis plasmáticos de LH aos 21 e 28 dias após o *clipamento*, ocorre uma tendência de redução nos níveis de testosterona aos 21 dias de hipertensão e uma redução efetiva nas concentrações deste hormônio aos 28 dias de *clipamento* devido a provável incapacidade do LH em estimular as células de Leydig a sintetizar testosterona na presença de altas concentrações de Ang II.

5. Participação da prolactina na modulação da função reprodutiva de ratos 2R1C

Dados clínicos e de experimentação animal revelam que a prolactina está implicada na regulação da função reprodutiva (revisão: Drago, 1984; Drago & Lissandrello, 2000; Gill-Sharma, 2009). A expressão de receptores de prolactina em regiões como a área pré-óptica e o núcleo arqueado confirmam as evidências da participação da prolactina na reprodução (Kokay et al., 2011). O aumento agudo nas concentrações de prolactina tem sido considerado um fator facilitador ou, pelo menos, não prejudicial da função sexual (Drago et al., 1981; Krüger et al., 2003), sugerindo-se uma associação com o estímulo do sistema dopaminérgico na APOM, sistema mesolímbico e trato nigroestriatal nesse processo (Hull et al., 2004). Por outro lado, a hiperprolactinemia crônica está relacionada com a disfunção sexual em humanos e roedores (Doherty et al., 1986; Cruz-Casallas et al., 1999; Buvat, 2003; Knegtering et al., 2003), pois o estímulo prolongado da transmissão dopaminérgica central pode causar hipossensibilidade ou *down regulation* do sistema receptor de dopamina (Mohankumar et al., 1997), causando dano à função sexual.

Dados recentes do nosso laboratório mostraram uma associação entre o aumento nas concentrações plasmáticas de prolactina, redução nas concentrações circulantes de testosterona e o comprometimento da função reprodutiva de ratos após 28 dias de hipertensão renovascular, sugerindo, também, a participação da Ang II nesse processo (Breigeron et al., 2007).

A Ang II é um importante regulador da secreção de prolactina apresentando uma dualidade de efeitos. Na hipófise anterior, a Ang II é um potente estimulador da liberação de prolactina pelo lactotrofo (Aguilera et al., 1982; Steele e cols., 1981), enquanto no SNC, por meio do núcleo arqueado, a Ang II exerce um efeito inibitório sobre a liberação desse hormônio (Steele et al., 1982; Jhören et al., 1997; Donadio et al., 2004). O efeito inibitório da Ang II sobre a secreção de prolactina é mediado por um aumento da liberação de dopamina no sistema porta-hipofisário, envolvendo a ação excitatória da Ang II sobre os neurônios do sistema tuberoinfundibular (Steele et al., 1982). As ações da Ang II, tanto na hipófise quanto no núcleo arqueado, são mediadas pelos receptores AT1 (Aguilera et al., 1982; Jören et al., 1997; Donadio et al., 2004; Seltzer et al., 1993).

No presente trabalho, houve um aumento nas concentrações plasmáticas de prolactina nos animais hipertensos pertencentes aos grupos 14, 21 e 28 dias de *clipamento*. Nesses grupos também ocorreu uma elevação progressiva, cronologicamente, nas concentrações plasmáticas de Ang II e um maior comprometimento do comportamento sexual, reforçando a ação Ang II e da hiperprolactinemia na inibição da função sexual. Sugerimos que o efeito da Ang II sobre os receptores AT1 localizados nos lactotrofos da hipófise anterior

tenha promovido o aumento crônico nas concentrações plasmáticas de prolactina, contribuindo para a disfunção sexual observada.

6. Participação da corticosterona na função reprodutiva de ratos

O CRH, um regulador fisiológico do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, é sintetizado principalmente no PVN, atua nos corticotrofos da hipófise anterior promovendo a liberação de ACTH e produz, como produto final, a secreção de corticosterona pelas adrenais de roedores (Carrasco & Van de Kar, 2003). A presença de CRH no hipotálamo e em outras regiões encefálicas sugere sua participação simultânea na regulação de respostas circulatórias e comportamentais, que são adaptativas, especialmente em situações de estresse (Emeric-Sauval, 1986). Além disso, o CRH tem importante ação central anti-reprodutiva (Sirinathsinghji et al., 1983; Rivier et al., 1996), reduzindo o comportamento sexual em ratos (Emeric-Sauval, 1986), e influência regulatória inibitória sobre a função testicular (Ulisse et al., 1990; Dufau et al., 1993). Nos testículos, a ação do CRH nas células de Leydig inibe as vias de sinalização e geração de AMPc induzida por LH, reduzindo, conseqüentemente, a esteroidogênese (Dufau et al., 1989; Fabbri et al., 1990). Também há registros que a exposição pré-natal de ratos à corticosterona reduz o comportamento sexual do macho adulto, bem como as concentrações de testosterona (Oliveira et al., 2011).

Está estabelecido que a Ang II induz à secreção de CRH, ACTH e corticosterona (Rivier & Vale, 1983; Emeric-Sauval, 1986; Sumitomo et al., 1991). No PVN, os receptores AT1 estão envolvidos na expressão de RNAm para CRH durante o estresse (Jezova et al., 1998). Nessa direção, existe

registro na literatura evidenciando aumento nas concentrações plasmáticas de corticosterona em ratos com hipertensão renovascular (Zamir et al., 1983). Outros dados revelam que ratos tratados sistemicamente com angiotensina exógena por 4 semanas não possuem níveis basais de corticosterona alterados, mas apresentam aumento da expressão de RNAm para os receptores AT1 nas glândulas supra-renais, indicando uma sensibilização das adrenais para a Ang II, o que contribuiria para estimulação do eixo HHA em condições especiais como o estresse (Muller et al., 2007). Em contrapartida, a corticosterona também parece potencializar a ação da Ang II no SNC de ratos (Scheuer & Bechtold, 2001). No entanto, nossos dados revelam que os animais *clipados* não possuem alterações nas concentrações circulantes de corticosterona, apesar dos aumentos da Ang II. Estes resultados estão de acordo com alguns estudos clínicos que revelam excreção urinária de cortisol inalteradas em indivíduos hipertensos, quando comparados aos normotensos (Heaney et al., 1995). Embora outros dados clínicos indicam aumento no cortisol salivar em hipertensos (Nyklíček et al., 2005). Os resultados do nosso trabalho sugerem que algum mecanismo compensatório seja ativado em situações de Ang II circulante elevada, prevenindo o aumento nas concentrações plasmáticas de corticosterona em animais *clipados*. Especula-se que a Ang II estimule o PVN a sintetizar CRH, mas os consequentes aumentos nas concentrações de corticosterona seriam prevenidos pela ativação de vias do *feedback* inibitório sobre o eixo HPA, as quais possuem receptores para Ang II, como o hipocampo (Von Bohlen und Halbach & Albrecht, 1998ab), inibindo o aumento de corticosterona. De fato, estudo recente indentificou a ação do SRA

sobre o hipocampo de ratos hipertensos na mediação de respostas cognitivas (Pelisch et al., 2011).

7. Inibição da Espermatogênese de ratos 2R1C

Estudos anteriores do nosso laboratório identificaram que ratos com 28 dias de *clipamento* apresentam comprometimento da espermatogênese. Esses dados foram confirmados no nosso trabalho e, somado a isso, identificamos que o dano ao processo espermatogênico inicia mais precocemente, aos 21 dias após o *clipamento*.

A espermatogênese é controlada hierarquicamente pela integração de diversos sistemas de regulação (Verhoeven et al., 2010). As células germinativas passam por uma rigorosa sequência de etapas de proliferação e diferenciação para culminar na formação dos espermatozóides (França et al., 1998; Brinster et al., 2002). No entanto, a conclusão bem sucedida desse processo depende de uma sucessão de etapas controladas, em última análise, pelo sistema endócrino, particularmente, pelo LH e FSH (McLachlan et al., 2002; Abel et al., 2008).

A produção de espermatozóides, ou fertilidade, e a secreção de testosterona, ou virilidade, ocorrem sob estímulo das gonadotrofinas hipofisiárias (do FSH e LH). A testosterona é essencial para iniciação e manutenção da espermatogênese, sendo secretada pelas células de Leydig sob estímulo do LH. A testosterona atua via receptores androgênicos nas células somáticas de Sertoli, Leydig e peritubulares. O FSH atua em receptores específicos, acoplados a proteína G, localizados exclusivamente nas células de Sertoli. O FSH tem papel chave no desenvolvimento dos testículos imaturos,

particularmente controlando a proliferação de células de Sertoli (McLachlan et al., 2002; Orth, 1993). Apesar de alguns dados conflitantes, com modelos animais e em humanos, existe consenso que algum grau de espermatogênese completa pode ser mantido na aparente ausência de FSH. No entanto, a espermatogênese quantitativamente normal em homens e macacos adultos é dependente de FSH. A secreção de FSH é regulada pelo *feedback* negativo do hormônio testicular, inibina B, e através de testosterona, principalmente através da sua aromatização para estradiol (Hayes et al., 2001). Nesse sentido, dados precedentes do nosso laboratório evidenciaram uma redução nas concentrações plasmáticas de FSH em ratos com 28 dias de hipertensão de origem renovascular e comprometimento da espermatogênese (Breigeiron et al., 2007).

Além disso, há evidências de que a Ang II regule a função gonadal. Sabe-se que a contração dos túbulos seminíferos é um importante requisito para eficiente regulação da espermatogênese e emissão espermática testicular e, nessa direção, estudos *in vitro* identificaram que a Ang II, através dos receptores AT1, induz o aumento no cálcio intracelular, crescimento e contração das células mióides peritubulares. Sugerindo-se, então, o envolvimento da Ang II na regulação parácrina da função dos túbulos seminíferos (Rossi et al., 2002), além de sua ação inibitória sobre as células de Leydig, reduzindo a síntese de testosterona (Khanum & Dufau, 1988). Somado a isso, a ativação dos receptores androgênicos localizados nas células mióides indica ser essencial para espermatogênese e função testicular normais (Welsh et al., 2009).

Os aumentos nas concentrações plasmáticas de prolactina aos 14, 21 e 28 dias após o *clipamento*, provavelmente devido a ação estimulatória da Ang II sobre a hipófise (Steele & Myers, 1990), também podem estar associados ao dano da espermatogênese. A prolactina controla a função testicular por dois caminhos, atuando na hipófise, onde inibe a síntese de LH e FSH (Bartke et al., 1977) e por ação nos testículos, modulando a formação de testosterona induzida pelo LH (Zipf et al., 1978). A participação da prolactina na espermatogênese é sugerida pelas evidências da expressão gênica de prolactina nas células de Leydig e em espermatogônias (Ishida et al., 2010). Além disso, dados mostram a existência de receptores de prolactina na células de Sertoli de ratos (Guillaumot & Benahamed, 1999). De fato, estudos recentes em camundongos apontam para participação da prolactina testicular tanto no processo espermiogênico, quanto no espermatogênico (Ishida et al., 2010). Outros dados indicam que a hiperprolactinemia em ratos causa alterações no processo de condensação da cromatina durante a espermiogênese, o que leva à queda na qualidade dos espermatozóides determinando infertilidade (Gill-Sharma, 2009). No nosso trabalho, sugerimos que o aumento na concentração plasmática de prolactina possa contribuir ao dano da espermatogênese por atrasar a maturação das espermátides.

No declínio da espermatogênese em ratos hipertensos, também é importante considerar a participação do dano vascular nesse processo. Ratos espontaneamente hipertensos (SHR) apresentam grande redução no número de espermátides maduras e imaturas, diminuição da concentração do citosol testicular e regresso funcional das células de Sertoli, sugerindo-se a associação desse declínio funcional com as modificações estruturais das

arteríolas testiculares decorrentes da hipertensão (Itoh et al., 1995; Akagashi et al., 1997).

8. Efeitos do antagonismo dos receptores AT1 sobre a função reprodutiva de ratos 2R1C

Neste estudo, os animais *clipados* ou com cirurgia fictícia por 28 dias, que receberam o tratamento com losartan, apresentaram um aumento nas concentrações plasmáticas de Ang II. Além disso, o losartan preveniu o aumento na PAS dos ratos pertencentes ao grupo *clipado*. Esse dado corrobora achados da literatura que indicam uma normalização da pressão arterial e um aumento nas concentrações circulantes de renina e de Ang II em pacientes hipertensos, recebendo tratamento com antagonista dos receptores AT1 (Christen et al., 1991; Munafo, 1992; Tsunoda et al., 1993; Pals, 1993). Além disso, o tratamento com losartan, previamente à injeção de anogiotensina exógena em indivíduos normotensos, previne o aumento na pressão arterial (Christen et al., 1991; Mazzolai et al., 1999). Estudos clínicos em indivíduos normotensos, igualmente evidenciam aumento nas concentrações plasmáticas de renina e de Ang II após o recebimento de antagonistas dos receptores AT1 (Mazzolai et al., 1999). As elevações nas concentrações plasmáticas de Ang II em normotensos e hipertensos que receberam tratamento com antagonista AT1 indicam a maior disponibilidade de Ang II circulante, a qual não consegue se ligar aos receptores AT1 bloqueados. Somado a isso, o antagonismo dos receptores AT1 interrompe o *feedback* negativo da Ang II sobre as células granulares secretoras de renina, levando ao aumento reativo na atividade da renina plasmática e nas concentrações circulantes de Ang II. Desse modo, as

concentrações plasmáticas de renina e Ang II são usadas como marcadores indiretos do grau de bloqueio dos receptores AT1 (Christen et al., 1991; Mazzolai et al., 1999).

Há evidências sugerindo que os receptores AT1, principalmente do RVLM e PVN, estão envolvidos no aumento do reflexo cardíaco simpático aferente de ratos com hipertensão renovascular (Campos et al., 2011), já que a administração central de losartan normaliza o reflexo cardíaco simpático aferente e reduz a atividade do nervo simpático renal, diminuindo a pressão arterial média (Zhu et al., 2009).

No nosso trabalho, mostramos que o tratamento sistêmico com losartan reverteu o dano ao comportamento sexual dos ratos com 28 dias de hipertensão. Considerando-se que o losartan ultrapassa a barreira hematoencefálica (Song et al., 1991b; Tedesco et al., 1999), é provável a ocorrência do bloqueio dos receptores AT1 centralmente, inibindo a ação das altas concentrações de Ang II em áreas implicadas na mediação do comportamento sexual como APOM (Hurtazo et al., 2008) e AMe (Kondo & Arai, 1995), promovendo um efeito favorável sobre a função sexual. Nossos resultados corroboram dados em que ratos SHR tratados com losartan também apresentam uma melhora do comportamento sexual, quando comparados ao grupo que não recebeu esse tratamento (Chan et al., 1999).

É importante considerar que a patogênese da disfunção sexual associada à hipertensão pode ser multifatorial. O aumento da pressão arterial está vinculado a alterações funcionais e estruturais nas paredes dos vasos sanguíneos. A disfunção endotelial pode causar disfunção erétil, porque o endotélio vascular desempenha papel central no controle do tônus vascular

(Kochar et al., 1999). Assim, o dano à função arterial peniana ocorre em muitos pacientes hipertensos (Müller et al., 1991). Também estudos sugerem que ratos hipertensos apresentam um aumento da atividade simpática na uretra e próstata, o que pode ter relação com a disfunção erétil (Tong et al., 1996). A injeção de Ang II no corpo cavernoso de cães causa contração do músculo liso local e cessa a ereção espontânea, enquanto a administração de losartan resulta em relaxamento do músculo liso local e ereção (Kifor et al., 1997), sugerindo-se a participação da Ang II, mediada pelos receptores AT1, como um importante modulador da função erétil. Este mesmo estudo identificou imunorreatividade à Ang II no endotélio dos vasos sanguíneos e no músculo liso dos corpos cavernosos de humanos. De fato, o uso terapêutico de antagonistas dos receptores AT1 por pacientes hipertensos tem sido vinculado a melhora da atividade sexual (Della Chiesa et al., 2003). O efeito benéfico dos bloqueadores dos receptores AT1 pode ser justificado pelas evidências da literatura sugerindo que a inibição dos receptores AT1 estimularia a desinibição dos receptores AT2, potencializando a ligação da Ang II a estes receptores com o desencadeamento de seus efeitos positivos sobre a pressão arterial e função sexual (Barker et al., 2006; Ferrario & Levy, 2002; Bregonzio et al., 2008). Reforçando a ação da Ang II na função erétil, estudo realizado em ratos SHR, envolvendo transplante renal entre grupos tratados e não tratados com losartan, identificou que os ratos SHR previamente tratados com losartan, a cada um dos quais foi doado um rim não tratado, apresentaram maior pressão arterial, mas o dobro do número de ereções em comparação com o grupo SHR apresentando baixa pressão arterial decorrente do transplante de um rim tratado (Hannan et al., 2006). Este resultado indica que a disfunção erétil é

mediada principalmente por ações da Ang II e, em menor magnitude, por alterações da pressão arterial.

Somado a isso, a terapia com outros agentes anti-hipertensivos como diuréticos, anti-adrenérgicos e β -bloqueadores, que não interferem na maioria dos efeitos da Ang II, podem agravar o risco de disfunção sexual em humanos hipertensos (Croog et al., 1988; Rosen, 1997; Ferrario & Levy, 2002), reafirmando a participação da Ang II na regulação da função sexual.

No nosso trabalho, o tratamento com losartan confirmou as evidências do efeito positivo da testosterona sobre a função sexual, já que as concentrações deste hormônio elevaram-se significativamente, com o bloqueio dos receptores AT1, associado à prevenção do comprometimento de todos os parâmetros do comportamento sexual no grupo *clipado* por 28 dias. Semelhante a esse achado, pacientes hipertensos relatam uma melhora da função sexual após o tratamento com losartan (Llisterri et al., 2001), embora a terapia com antagonista dos receptores AT1 não tenha sido associada a aumentos significativos nos níveis plasmáticos de testosterona (Fogari et al., 2002). Sugerimos que a elevação nas concentrações plasmáticas de testosterona, decorrentes do tratamento com losartan, seria um dos fatores que contribuiria para a melhora da função sexual ao favorecer a ação central deste hormônio, principalmente na APOM, o que promoveria a liberação de óxido nítrico (Hull et al., 2004), facilitando o comportamento sexual.

O predomínio dos receptores AT1 sobre os AT2 nas células de Leydig (Kitami et al., 1992; Speth et al., 1999), confirma a ação do losartan em aumentar a síntese de testosterona ao impedir a ação inibitória da Ang II sobre LH, em condições de bloqueio dos receptores AT1.

Nosso trabalho também mostrou que o tratamento com losartan preveniu o aumento nas concentrações de LH nos ratos *clipados*. Neste caso, as concentrações plasmáticas de testosterona estão elevadas e, portanto, o *feedback* negativo deste hormônio sobre a APOM, para culminar na liberação de LH, estaria inibido. Além disso, dados revelam que o losartan ultrapassa a barreira hemato-encefálica, quando administrado sistemicamente (Song et al., 1991b; Tedesco et al., 1999), sendo eficaz em inibir o aumento da secreção de LH pelo estímulo central de Ang II em ratas ovariectomizadas com reposição dos hormônios ovarianos (Palmer et al., 1994). Nossos dados indicam que o aumento da secreção de LH pelas altas concentrações de Ang II atuando centralmente é prevenido com antagonismo dos receptores AT1 pelo losartan.

Além disso, o tratamento com losartan preveniu o aumento nas concentrações plasmáticas de prolactina nos ratos *clipados* por 28 dias. Evidências da literatura mostram que o bloqueio central dos receptores AT1 ou dos receptores AT2, inibe a liberação de prolactina (Stephenson & Steele, 1992). Nossos resultados indicam que o tratamento com losartan impossibilita o efeito das altas concentrações de Ang II sobre os receptores AT1 localizados nos lactotrofos, impedindo a hiperprolactinemia nos ratos *clipados*.

Apesar dos dados da literatura indicarem que a ação do CRH pode ser potencializada pela Ang II (Emeric-Sauval, 1986), os animais *clipados* do nosso estudo não apresentaram modificações nas concentrações plasmáticas de corticosterona e o tratamento com losartan igualmente não promoveu alterações nas concentrações de corticosterona no grupo que recebeu o tratamento. Nesse sentido, trabalhos identificaram que o antagonismo dos receptores AT1 por tratamento crônico, via sistêmica, não afeta as

concentrações basais de corticosterona e ACTH em ratos SHR (Raasch et al., 2006). Injeções centrais de losartan também não modificam as concentrações basais, ou sob estresse agudo, de corticosterona e ACTH em roedores (Jezova et al., 1998). Entretanto, outros trabalhos indicam que o losartan pode prevenir as elevações nas concentrações de corticosterona decorrentes do estresse crônico (Uresin et al., 2004). Já dados clínicos relatam a ausência de efeito inibitório do losartan sobre a concentração plasmática de cortisol após injeções de ACTH (Sasaki et al., 1995).

O tratamento com losartan preveniu a redução do quociente de espermátides e o aumento do trânsito epididimário de ratos com 28 dias de *clipamento*. Este dado confirma a participação da Ang II e dos receptores AT1 na regulação da espermatogênese. Tem sido mostrado a participação do SRA testicular na função espermática e fertilidade, já que, em condições fisiológicas normais, a Ang II mantém a mobilidade espermática em ratos e humanos mediante ativação dos receptores AT1 (Vinson et al., 1995, 1996).

Além disso, há evidências da participação da Ang II e dos receptores AT1 no mecanismo do estresse oxidativo vascular na hipertensão, uma vez que ratos SHR tratados cronicamente com losartan apresentam redução na produção de ânions superóxidos, aumentando a disponibilidade de óxido nítrico nas arteríolas mesentéricas (Dantas et al., 2004). Isso indica que o antagonismo dos receptores AT1 pode prevenir tanto o dano estrutural às arteríolas testiculares, bem como o regresso funcional das células de Sertoli decorrentes da hipertensão.

No nosso estudo, propomos que o bloqueio dos receptores AT1 impeça os efeitos negativos diretos das altas concentrações de Ang II sobre a

movilidade espermática. Além disso, a Ang II não agiria sobre a ligação do LH aos seus respectivos receptores testiculares, aumentando a síntese de testosterona, que pode ser verificada nos nossos resultados. O aumento nas concentrações plasmáticas de testosterona favorece a ativação do processo espermatogênico e maturação dos espermatozóides. A prevenção da hiperprolactinemia pelo tratamento com losartan também parece contribuir para manutenção de um processo espermatogênico fisiológico nos animais *clipados*, já que o aumento crônico da prolactina pode interferir no processo de maturação dos espermatozóides, provavelmente, por modificar a sua ligação aos receptores de prolactina localizados nas células de Sertoli, bem como pode causar perda na qualidade dos espermatozóides por interferir no mecanismo de condensação da cromatina durante a espermiogênese.

VII- CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitem formular as seguintes conclusões:

- A aplicação do modelo 2R1C em ratos dos quatro grupos estudados induziu ao aumento nas concentrações plasmáticas de Ang II, promovendo a elevação da PAS e comprometimento do comportamento sexual;
- No grupo com 7 dias de hipertensão, a elevação nas concentrações plasmáticas de Ang II e a redução nas concentrações plasmáticas de LH parecem estar associadas com a diminuição na frequência de intromissões;
- No grupo com 14 dias de hipertensão, as elevações nas concentrações plasmáticas de Ang II e de prolactina parecem estar associadas com a redução na frequência de intromissões e o aumento nas latências da intromissão e da ejaculação;
- No grupo com 21 de hipertensão, as elevações nas concentrações plasmáticas de Ang II, prolactina e LH, somada a tendência de redução na testosterona circulante, parecem estar associadas com a redução na frequência de intromissões e o aumento nas latências da intromissão e da ejaculação, além da redução do quociente de espermátides nos testículos e aumento do trânsito epididimário total;
- No grupo com 28 de hipertensão, as elevações nas concentrações plasmáticas de Ang II, prolactina e LH e, também, a redução nas concentrações plasmáticas de testosterona parecem estar associadas com a

redução na frequência de intromissões e aumento nas latências da intromissão e da ejaculação, além da redução do quociente de espermátides nos testículos e aumento do trânsito epididimário total;

- O antagonismo dos receptores AT1 pelo tratamento com losartan promoveu o aumento nas concentrações plasmáticas de Ang II nos grupos *clipado* ou com cirurgia fictícia por 28 dias, inferindo-se a efetividade do tratamento pelo aumento da Ang II livre na circulação que não se liga aos receptores AT1 bloqueados;

- O tratamento com losartan normalizou a pressão arterial e preveniu as alterações da prolactina, do LH, do comportamento sexual e da espermatogênese de ratos hipertensos por 28 dias, confirmando a participação da Ang II nos desfechos avaliados;

- Animais hipertensos dos quatro grupos não apresentaram alterações nas concentrações plasmáticas basais de corticosterona.

Considerando o conjunto de resultados, concluímos:

- Animais hipertensos apresentam comprometimento precoce do comportamento sexual, sendo que o maior tempo de hipertensão produz maior prejuízo do comportamento sexual;

- O aumento cronologicamente progressivo nas concentrações plasmáticas de Ang II nos animais hipertensos parece estar associado ao maior prejuízo do comportamento sexual;

- A Ang II parece ser o principal fator causador do dano ao comportamento sexual de ratos hipertensos, pois, dentre os hormônios reprodutivos estudados, somente a Ang II estava alterada em todos os tempos de hipertensão

analisados e, além disso, o antagonismo dos receptores AT1 no grupo com 28 de *clipamento* preveniu o prejuízo de todos os parâmetros do comportamento sexual avaliados;

- Animais hipertensos apresentam comprometimento da espermatogênese após 21 ou 28 dias do *clipamento*, sugerindo-se que a evolução do tempo de hipertensão prejudica a fertilidade;

- As elevações nas concentrações plasmáticas de Ang II, associadas ao aumento nas concentrações plasmáticas de prolactina e de LH e a redução na testosterona circulante parecem contribuir para o dano da espermatogênese e do comportamento sexual dos ratos hipertensos.

VIII- PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados nesta tese indicam a associação entre hipertensão arterial e dano da função reprodutiva em ratos, apontando a participação da Ang II como importante fator causador de alterações neuroendócrinas e comportamentais nesse processo patológico. Nesse sentido, estudos adicionais poderiam contribuir para continuidade das investigações sobre os mecanismos neurais e sistêmicos envolvidos na patogênese da reprodução em machos hipertensos. Assim, sugerimos as seguintes investigações:

- Avaliar a participação dos receptores AT2 na modulação da função reprodutiva de ratos hipertensos, já que existem evidências na literatura do envolvimento desses receptores na modulação do comportamento sexual de roedores.
- Verificar os efeitos das altas concentrações de Ang II sobre a síntese de óxido nítrico em regiões centrais, como a APOM, e periféricamente nas arteríolas testiculares, pois o óxido nítrico é um dos agentes que atua na neurotransmissão dopaminérgica na APOM e participa da regulação da função endotelial.
- Avaliar se o tratamento com antagonistas dos receptores AT1 seria capaz de reverter os danos reprodutivos já instalados em ratos com, pelo menos, 28 dias de hipertensão, a fim de verificar se existem comprometimentos irreversíveis associados a esses receptores.

IX- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdo CH, Oliveira WM Jr, Scanavino Mde T, Martins FG. 2006. Erectile dysfunction: results of the Brazilian Sexual Life Study. *Rev Assoc Med Bras.*; 52(6):424-9.
- Abel MH, Baker PJ, Charlton HM, Monteiro A, Verhoeven G, De Gendt K, Guillou F, O'Shaughnessy PJ. 2008. Spermatogenesis and sertoli cell activity in mice lacking sertoli cell receptors for follicle-stimulating hormone and androgen. *Endocrinology.*; 149(7):3279-85.
- Agarwal A, Nandipati KC, Sharma RK, Zippe CD, Raina R. 2006. Role of oxidative stress in the pathophysiological mechanism of erectile dysfunction. *J Androl.*; 27(3):335-47.
- Agmo A. 1997. Male rat sexual behavior. *Brain Res. Protoc.*; 1(2):203-9.
- Aguilera G, Hyde CL, Catt KJ. 1982. Angiotensin II receptors and prolactin release in pituitary lactotrophs. *Endocrinology.*; 111(4):1045-50.
- Akagashi K, Kumamoto Y, Itoh N, Tsukamoto T, Suzuki T, Ohta Y. 1997. Manidipine improves spermatogenesis in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *J Androl.*; 18(2):210-6.
- Babichev VN, Shishkina IV, Peryshkova TA. 1990. The effect of neonatal castration of male rats on the level of sex-hormone receptors in the hypothalamus and hypophysis of adult animals. *Biomed Sci.*;1(2):189-92.

- Barker TA, Massett MP, Korshunov VA, Mohan AM, Kennedy AJ, Berk BC. 2006. Angiotensin II type 2 receptor expression after vascular injury: differing effects of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin receptor blockade. *Hypertension.*; 48(5):942-9.
- Bartke A, Goldman BD, Bex F, Dalterio S. 1977. Effects of prolactin (PRL) on pituitary and testicular function in mice with hereditary PRL deficiency. *Endocrinology.*; 101(6):1760-6.
- Beach FA & Holz-Tucker AM. 1949. Effects of different concentrations of androgen upon sexual behavior in castrated male rats. *J Comp Physiol Psychol.*; 42(6):433-53.
- Berne RM, Levy MN, Koepfen BM, Stanton BA. 2009. Seção: O Sistema Endócrino. In: Fisiologia. Ed. Elsevier, 6^a ed.
- Berry C, Hamilton CA, Brosnan MJ, Magill FG, Berg GA, McMurray JJ, Dominiczak AF. 2000. Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels: angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries. *Circulation*; 101: 2206–2212.
- Beyer C, Contreras JL, Moralí G, Larsson K. 1981. Effects of castration and sex steroid treatment on the motor copulatory pattern of the rat. *Physiol Behav.*; 27(4):727-30.
- Bex F, Bartke A, Goldman BD, Dalterio S. 1978. Prolactin, growth hormone, luteinizing hormone receptors, and seasonal changes in testicular activity in the golden hamster. *Endocrinology.*; 103(6):2069-80.
- Bickerton RH, Buckley JP. 1961. Evidence for a central mechanism in angiotensin induced hypertension. *Proc Soc Exp Biol Med.* 106:834-836.

- Białek M, Zaremba P, Borowicz KK, Czuczwar SJ. 2004. Neuroprotective role of testosterone in the nervous system. *Pol J Pharmacol.*; 56(5):509-18.
- Border WA, Noble NA. 1998. Interactions of transforming growth factor-beta and angiotensin II in renal fibrosis. *Hypertension.*; 31(1 Pt 2):181-8.
- Bottari SP, Gasparo M, Steckelins UM, Levens NR. 1993. Angiotensin II receptor subtypes: characterization, signalling mechanisms and possible physiological implications. *Front Neuroendocrinol.*, 14(2): 123-71.
- Bregonzio C, Seltzer A, Armando I, Pavel J, Saavedra JM. 2008. Angiotensin II AT(1) receptor blockade selectively enhances brain AT(2) receptor expression, and abolishes the cold-restraint stress-induced increase in tyrosine hydroxylase mRNA in the locus coeruleus of spontaneously hypertensive rats. *Stress.*; 11(6):457-66.
- Breigeiron MK, Lucion AB, Sanvitto GL. 2007. Effects of renovascular hypertension on reproductive function in male rats. *Life Sci.*; 80(17):1627-34.
- Breigeiron MK, Morris M, Lucion AB, Sanvitto GL. 2002. Effects of angiotensin II microinjected into medial amygdala on male sexual behavior in rats. *Horm Behav.*; 41(3):267-74.
- Brinster RL. 2002. Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science.*; 296(5576):2174-6.
- Bumpus FM, Catt KJ, Chiu AT, DeGasparo M, Goodfriend T, Husain A, Peach MJ, Taylor DG Jr, Timmermans PB. 1991. Nomenclature for angiotensin receptors. A report of the Nomenclature Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertension.*; 17(5):720-1.
- Buñag RD. 1973. Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *J Appl Physiol.*; 34(2):279-82.

- Buvat J. 2003. Hyperprolactinemia and sexual function in men: a short review. *Int J Impot Res.*; 15(5):373-7
- Campos RR. 2009. Oxidative stress in the brain and arterial hypertension. *Hypertens Res.*; 32(12):1047-8.
- Campos RR, Bergamaschi CT. 2006. Neurotransmission alterations in central cardiovascular control in experimental hypertension. *Curr Hypertens Rev.*; 2: 193–198.
- Campos RR, Oliveira-Sales EB, Nishi EE, Boim MA, Dolnikoff MS, Bergamaschi CT. 2011. The role of oxidative stress in renovascular hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*; 38(2):144-52.
- Carey RM & Siragy HM. 2003. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev*; 24:261-271.
- Carrasco GA, Van de Kar LD. 2003. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol.*; 463(1-3):235-72.
- Chan P, Liu JC, Tong YC, Chen YJ, Wang CC, Tomlinson B, Cheng JT. 1999. Effects of losartan on the sexual behavior of male rats. *Pharmacology.*; 58(3):132-9.
- Cheng J, Zhou W, Warner GM, Knudsen BE, Garovic VD, Gray CE, Lerman LO, Platt JL, Romero JC, Textor SC, Nath KA, Grande JP. 2009. Temporal analysis of signaling pathways activated in a murine model of two-kidney, one-clip hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol.*; 297(4):F1055-68.

- Chiu AT, McCall DE, Price WA, Wong PC, Carini DJ, Duncia JV, Wexler RR, Yoo SE, Johnson AL, Timmermans PB. 1990. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. VII. Cellular and biochemical pharmacology of DuP 753, an orally active antihypertensive agent. *J Pharmacol Exp Ther.*; 252(2):711-8.
- Christen Y, Waeber B, Nussberger J, Porchet M, Borland RM, Lee RJ, Maggon K, Shum L, Timmermans PB, Brunner HR. 1991. Oral administration of DuP 753, a specific angiotensin II receptor antagonist, to normal male volunteers. Inhibition of pressor response to exogenous angiotensin I and II. *Circulation.*; 83(4):1333-42.
- Clark JT. 1988. A possible role for angiotensin II in the regulation of male sexual behavior in rats. *Physiol. Behav.*; 45:221–224.
- Clark JT. 1995. Sexual function in altered physiological states: comparison of effects of hypertension, diabetes, hyperprolactinemia, and others to "normal" aging in male rats. *Neurosci Biobehav Rev.*; (2):279-302.
- Clark JT, Micevych PE, Panossian V, Keaton AK. 1995. Testosterone-induced copulatory behavior is affected by the postcastration interval. *Neurosci Biobehav Rev.*; 19(3):369-76.
- Croog SH, Levine S, Sudilovsky A, Baume RM, Clive J. 1988. Sexual symptoms in hypertensive patients. A clinical trial of antihypertensive medications. *Arch Intern Med.*; 148(4):788-94.
- Cruz-Casallas PE, Nasello AG, Hucke EE, Felicio LF. 1999. Dual modulation of male sexual behavior in rats by central prolactin: relationship with in vivo striatal dopaminergic activity. *Psychoneuroendocrinology.*; 24(7):681-93.

- Culler MD, Negro-Vilar A. 1986. Evidence that pulsatile follicle-stimulating hormone secretion is independent of endogenous luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology*.; 118(2):609-12.
- Dantas AP, Franco Mdo C, Silva-Antonialli MM, Tostes RC, Fortes ZB, Nigro D, Carvalho MH. 2004. Gender differences in superoxide generation in microvessels of hypertensive rats: role of NAD(P)H-oxidase. *Cardiovasc Res*.; 61(1):22-9.
- DeForrest JM, Knappenberger RC, Antonaccio MJ, Ferrone RA, Creekmore JS. 1982. Angiotensin II is a necessary component for the development of hypertension in the two kidney, one clip rat. *Am J Cardiol*.; 49(6):1515-7.
- Della Chiesa A, Pfiffner D, Meier B, Hess OM. 2003. Sexual activity in hypertensive men. *J Hum Hypertens*.;17(8):515-21.
- Dewsbury DA. 1972. Patterns of copulatory behavior in male mammals. *Q Rev Biol*.; 47(1):1-33.
- Dobrian AD, Schriver SD, Lynch T, Prewitt RL. 2003. Effect of salt on hypertension and oxidative stress in a rat model of diet-induced obesity. *Am J Physiol Renal Physiol*.; 285(4):F619-28.
- Doherty PC, Baum MJ, Todd RB. 1986. Effects of chronic hyperprolactinemia on sexual arousal and erectile function in male rats. *Neuroendocrinology*.; 42(5):368-75.
- Donadio MV, Sagae SC, Franci CR, Anselmo-Franci JA, Lucion AB, Sanvitto GL. 2004. Angiotensin II receptors in the arcuate nucleus mediate stress-induced reduction of prolactin secretion in steroid-primed ovariectomized and lactating rats. *Brain Res*.; 1006(1):59-65.

- Dornelles RC, Franci CR. 1998. Action of AT1 subtype angiotensin II receptors of the medial preoptic area on gonadotropins and prolactin release. *Neuropeptides*.; 32(1):51-5.
- Drago F. 1984. Prolactin and sexual behavior: a review. *Neurosci Biobehav Rev*.; 8(4):433-9.
- Drago F, Lissandrello CO. 2000. The "low-dose" concept and the paradoxical effects of prolactin on grooming and sexual behavior. *Eur J Pharmacol*.; 405(1-3):131-7.
- Drago F, Pellegrini-Quarantotti B, Scapagnini U, Gessa GL. 1981. Short-term endogenous hyperprolactinaemia and sexual behavior of male rats. *Physiol Behav*.; 26(2): 277-79.
- Du J, Lorrain DS, Hull EM. 1998. Castration decreases extracellular, but increases intracellular, dopamine in medial preoptic area of male rats. *Brain Res*.; 782(1-2):11-7.
- Dufau ML, Tinajero JC, Fabbri A. 1993. Corticotropin-releasing factor: an antireproductive hormone of the testis. *FASEB J*. 1993 Feb 1;7(2):299-307.
- Dufau ML, Ulisse S, Khanum A, Buczko E, Kitamura M, Fabbri A, Namiki M. 1989. LH action in the Leydig cell: modulation by angiotensin II and corticotropin releasing hormone, and regulation of P450(17) alpha mRNA. *J Steroid Biochem*.; 34(1-6):205-17.
- Dzau VJ, Re R. 1994. Tissue angiotensin system in cardiovascular medicine. A paradigm shift? *Circulation*.; 89(1):493-8.
- Emeric-Sauval E. 1986. Corticotropin-releasing factor (CRF): a review. *Psychoneuroendocrinology*.; 11(3):277-94.

- Edwards DA, Einhorn LC. 1986. Preoptic and midbrain control of sexual motivation. *Physiol Behav.*; 37(2):329-35.
- Fabbri A, Tinajero JC, Dufau ML. 1990. Corticotropin-releasing factor is produced by rat Leydig cells and has a major local antireproductive role in the testis. *Endocrinology.*; 127(3):1541-3.
- Ferguson AV, Washburn DL, Latchford KJ. 2001. Hormonal and neurotransmitter roles for angiotensin in the regulation of central autonomic function. *Exp Biol Med (Maywood).*; 226(2):85-96.
- Ferrario CM. 2006. Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*; 7(1):3-14.
- Ferrario CM, Levy P. 2002. Sexual Dysfunction in Patients with Hypertension: Implications for Therapy. *J Clin Hypertens.*; 4:424–432.
- Fisher JP, Fadel PJ. 2010. Therapeutic strategies for targeting excessive central sympathetic activation in human hypertension. *Exp Physiol.*; 95(5):572-80.
- Fitzsimons JT. 1980. Angiotensin stimulation of the central nervous system. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.*; 87:117-67.
- Fogari R, Zoppi A, Preti P, Rinaldi A, Marasi G, Vanasia A, Mugellini A. 2002. Sexual activity and plasma testosterone levels in hypertensive males. *Am J Hypertens.*; 15(3):217-21.
- Franci CR, Anselmo-Franci JA, McCann SM. 1990. Opposite effects of central immunoneutralization of angiotensin II or atrial natriuretic peptide on luteinizing hormone release in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology.*; 51(6):683-7.

- França LR, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL, Russell LD. 1998. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol Reprod.*; 59(6):1371-7.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev.*; 80(4):1523-631.
- Ganong WF. 1993. Blood, pituitary, and brain renin-angiotensin systems and regulation of secretion of anterior pituitary gland. *Front Neuroendocrinol.*; 14(3):233-49.
- Ganong WF. 1995. Reproduction and the renin-angiotensin system. *Neurosci Biobehav Rev.*; 19(2):241-50.
- Garovic VD, Textor SC. 2005. Renovascular hypertension and ischemic nephropathy. *Circulation.*; 112(9):1362-74.
- Gil M, Bhatt R, Picotte KB, Hull EM. 2011. Oxytocin in the medial preoptic area facilitates male sexual behavior in the rat. *Horm Behav.* (In Press).
- Gill-Sharma MK. 2009. Prolactin and male fertility: the long and short feedback regulation. *Int J Endocrinol.*; (2009) 687259: 1-13.
- Giuliano F, Rampin O, Brown K, Courtois F, Benoit G, Jardin A. 1996. Stimulation of the medial preoptic area of the hypothalamus in the rat elicits increases in intracavernous pressure. *Neurosci Lett.*; 209(1):1-4.
- Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. 1934. Studies on Experimental Hypertension: I. The production of persistent elevation of systolic blood Pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med.*; 59(3):347-79.
- Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. 1994. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase. *Circ Res.*; 74: 1141–1148.

- Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW. 1993. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation*; 87:1816-1828.
- Grisk O, Rettig R. 2004. Interactions between the sympathetic nervous system and the kidneys in arterial hypertension. *Cardiovasc Res.*; 61: 238–246.
- Gronan RJ, York DH. 1978. Effects of angiotensin II and acetylcholine on neurons in the preoptic area. *Brain Res.*; 154(1):172-7.
- Guan S, Fox J, Mitchell KD, Navar LG. 1992. Angiotensin and angiotensin converting enzyme tissue levels in two-kidney, one clip hypertensive rats. *Hypertension*; 20(6):763-7.
- Guillaumot P, Benahmed M. 1999. Prolactin receptors are expressed and hormonally regulated in rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol.*; 149(1-2):163-8.
- Gutman MB, Ciriello J, Mogenson GJ. 1988. Effects of plasma angiotensin II and hypernatremia on subfornical organ neurons. *Am J Physiol.*; 254(5 Pt 2):R746-54.
- Hackam DG, Spence JD, Garg AX, Textor SC. 2007. Role of renin-angiotensin system blockade in atherosclerotic renal artery stenosis and renovascular hypertension. *Hypertension.*; 50(6):998-1003.
- Hannan JL, Smallegange C, Hale TM, Heaton JP, Adams MA. 2006. Impact of antihypertensive treatments on erectile responses in aging spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.*; 24(1):159-68.
- Harding SM, McGinnis MY. 2003. Effects of testosterone in the VMN on copulation, partner preference, and vocalizations in male rats. *Horm Behav.*; 43(2):327-35.

- Harris GC, Levine JE. 2003. Pubertal acceleration of pulsatile gonadotropin-releasing hormone release in male rats as revealed by microdialysis. *Endocrinology*; 144(1):163-71.
- Hayes FJ, DeCruz S, Seminara SB, Boepple PA, Crowley WF Jr. 2001. Differential regulation of gonadotropin secretion by testosterone in the human male: absence of a negative feedback effect of testosterone on follicle-stimulating hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab*; 86:53–58.
- Heaney AP, Ferguson T, Sheridan B, Atkinson AB. 1995. Cortisol excretion in essential hypertension. *J Hum Hypertens*; 9(12):947-51.
- Hermanns U, Hafez ES. 1981. Prolactin and male reproduction. *Arch Androl*; 6(2):95-125.
- Hess RA, França LR. 2007. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: Molecular mechanisms in spermatogenesis. Ed.Cheng CY, p. 1-15. Landes Bioscience.
- Hiney JK, Sower SA, Yu WH, McCann SM, Dees WL. 2002. Gonadotropin-releasing hormone neurons in the preoptic-hypothalamic region of the rat contain lamprey gonadotropin-releasing hormone III, mammalian luteinizing hormone-releasing hormone, or both peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*; 99(4):2386-91.
- Huang WC, Ploth DW, Navar LG. 1982. Effects of saralasin infusion on bilateral renal function in two-kidney, one-clip Goldblatt hypertensive rats. *Clin Sci (Lond)*; 62(6):573-9.
- Hull EM, Bitran D, Pehek EA, Warner RK, Band LC, Holmes GM 1986. Dopaminergic control of male sex behavior in rats: effects of an intracerebrally-infused agonist. *Brain Res*; 370(1):73-81.

- Hull EM, Dominguez JM. 2007. Sexual behavior in male rodents. *Horm Behav.*; 52(1):45-55.
- Hull EM, Muschamp JW, Sato S. 2004. Dopamine and serotonin: influences on male sexual behavior. *Physiol Behav.*; 83(2):291-307.
- Hurtazo HA, Paredes RG, Agmo A. 2008. Inactivation of the medial preoptic area/anterior hypothalamus by lidocaine reduces male sexual behavior and sexual incentive motivation in male rats. *Neuroscience.*; 152(2):331-7.
- Ishida M, Yoshida M, Fukuta S, Uemura K, Iijima M, Horiguchi K, Harigaya T. 2010. Analysis of prolactin gene expression and cleaved prolactin variants in the mouse testis and spermatozoa. *J Reprod Dev.*; 56(6):567-74.
- Itoh N, Akagashi K, Kumamoto Y, Suzuki T, Ohta Y. 1995. Influence of hypertensive vascular changes in intratesticular arteries on spermatogenesis in SHRSP. *Clin Exp Pharmacol Physiol Supp.*; 22(1):S134-5.
- Jensen J, Lendorf A, Stimpel H, Frost J, Ibsen H, Rosenkilde P. 1999. The prevalence and etiology of impotence in 101 male hypertensive outpatients. *Am J Hypertens.*; 12(3):271-5.
- Jezova D, Ochedalski T, Kiss A, Aguilera G. 1998. Brain angiotensin II modulates sympathoadrenal and hypothalamic pituitary adrenocortical activation during stress. *J Neuroendocrinol.*; 10(1):67-72.
- Johnson L. 1995. Efficiency of spermatogenesis. *Microsc Res Tech.*; 32(5):385-422.
- Johnson L, Varner DD, Roberts ME, Smith TL, Keillor GE, Scrutchfield WL. 2000. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Anim Reprod Sci.*; 60-61:471-80.

- Jöhren O, Imboden H, Häuser W, Maye I, Sanvitto GL, Saavedra JM. 1997. Localization of angiotensin-converting enzyme, angiotensin II, angiotensin II receptor subtypes, and vasopressin in the mouse hypothalamus. *Brain Res.*; 757(2):218-27.
- Junqueira LC, Carneiro J. 2004. *Histologia Básica*. 10ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Katsunuma N, Tsukamoto K, Ito S, Kanmatsuse K. 2003. Enhanced angiotensin-mediated responses in the nucleus tractus solitarii of spontaneously hypertensive rats. *Brain Res Bull.*; 60(3):209-14.
- Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. 2005. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet.*; 365(9455):217-23.
- Keaton AK, Clark JT. 1998. Effects of angiotensin II on sexual function, blood pressure, and fluid intake are differentially affected by AT-1 receptor blockade. *Physiol Behav.*; 64(3):339-46.
- Khanum A, Dufau ML. 1988. Angiotensin II receptors and inhibitory actions in Leydig cells. *J Biol Chem.*; 263(11):5070-4.
- Kifor I, Williams GH, Vickers MA, Sullivan MP, Jodbert P, Dluhy RG. 1997. Tissue angiotensin II as a modulator of erectile function. I. Angiotensin peptide content, secretion and effects in the corpus cavernosum. *J Urol.*; 157(5):1920-5.
- Kitami Y, Okura T, Marumoto K, Wakamiya R, Hiwada K. 1992. Differential gene expression and regulation of type-1 angiotensin II receptor subtypes in the rat. *Biochem Biophys Res Commun.*; 188(1):446-52.

- Knegtering H, van der Moolen AE, Castelein S, Kluiters H, van den Bosch RJ. 2003. What are the effects of antipsychotics on sexual dysfunctions and endocrine functioning? *Psychoneuroendocrinology*.; 28 Suppl 2:109-23.
- Kochar MS, Mazur LI, Patel A. 1999. What is causing your patient's sexual dysfunction? Uncovering a connection with hypertension and antihypertensive therapy. *Postgrad Med.*; 106(2):149-52, 155-7.
- Kokay IC, Petersen SL, Grattan DR. 2011. Identification of prolactin-sensitive GABA and kisspeptin neurons in regions of the rat hypothalamus involved in the control of fertility. *Endocrinology*.; 152(2):526-35.
- Kondo Y, Arai Y. 1995. Functional association between the medial amygdala and the medial preoptic area in regulation of mating behavior in the male rat. *Physiol Behav.*; 57(1):69-73.
- Krüger TH, Haake P, Haverkamp J, Krämer M, Exton MS, Saller B, Leygraf N, Hartmann U, Schedlowski M. 2003. Effects of acute prolactin manipulation on sexual drive and function in males. *J Endocrinol.*; 179(3):357-65.
- Leblond CP, Clermont Y. 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann N Y Acad Sci.*; 55(4):548-73.
- Lenkei Z, Palkovits M, Corvol P, Llorens-Cortès C. 1997. Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. *Front Neuroendocrinol.*; 18(4):383-439.
- Llisterri JL, Lozano Vidal JV, Aznar Vicente J, Argaya Roca M, Pol Bravo C, Sanchez Zamorano MA, Ferrario CM. 2001. Sexual dysfunction in hypertensive patients treated with losartan. *Am J Med Sci.*; 321(5):336-41.

- Liu YC, Salamone JD, Sachs BD. 1997. Impaired sexual response after lesions of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in male rats. *Behav Neurosci.*; 111(6):1361-7.
- MacGregor DP, Murone C, Song K, Allen AM, Paxinos G, Mendelsohn FA. 1995. Angiotensin II receptor subtypes in the human central nervous system. *Brain Res.*; 675(1-2):231-40.
- MacLeod RM, Lehmeyer JE. 1974. Studies on the mechanism of the dopamine-mediated inhibition of prolactin secretion. *Endocrinology.*; 94(4):1077-85.
- Maliszewska-Scislo M, Chen H, Augustyniak RA, Seth D, Rossi NF. 2008. Subfornical organ differentially modulates baroreflex function in normotensive and two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*; 295(3):R741-50.
- Mancina G, Grassi G, Giannattasio C, Seravalle G. 1999. Sympathetic activation in the pathogenesis of hypertension and progression of organ damage. *Hypertension.*; 34(4 Pt 2):724-8.
- Mangiapane ML, Simpson JB. 1980. Subfornical organ: forebrain site of pressor and dipsogenic action of angiotensin II. *Am J Physiol.*; 239(5):R382-9.
- Mangurian LP, Walsh RJ, Posner BI. 1992. Prolactin enhancement of its own uptake at the choroid plexus. *Endocrinology.*; 131(2):698-702.
- Mann JF, Phillips MI, Dietz R, Haebara H, Ganten D. 1978. Effects of central and peripheral angiotensin blockade in hypertensive rats. *Am J Physiol.*; 234(5):H629-37.

- Marson L, McKenna KE. 1996. CNS cell groups involved in the control of the ischiocavernosus and bulbospongiosus muscles: a transneuronal tracing study using pseudorabies virus. *J Comp Neurol.*; 374(2):161-79.
- Mas M, Rodriguez del Castillo A, Guerra M, Davidson JM, Battaner E. 1987. Neurochemical correlates of male sexual behavior. *Physiol Behav.*; 41(4):341-5.
- Matsumura K, Averill DB, Ferrario CM. 1998. Angiotensin II acts at AT1 receptors in the nucleus of the solitary tract to attenuate the baroreceptor reflex. *Am J Physiol.*; 275(5 Pt 2):R1611-9.
- Mazaro R, Di Stasi LC, Filho SA, De Grava Kempinas W. 2000. Decrease in sperm number after treatment of rats with *Austroplenckia populnea*. *Contraception.*; 62(1):45-50.
- Mazaro R, Lamano-Carvalho TL. 2006. Prolonged deleterious effects of neonatal handling on reproductive parameters of pubertal male rats. *Reprod Fertil Dev.*; 18(4):497-500.
- Mazzolai L, Maillard M, Rossat J, Nussberger J, Brunner HR, Burnier M. 1999. Angiotensin II receptor blockade in normotensive subjects: A direct comparison of three AT1 receptor antagonists. *Hypertension.*; 33(3):850-5.
- McEwen BS. 1978. Sexual maturation and differentiation: the role of the gonadal steroids. *Prog Brain Res.* 1978;48:291-308.
- McGinnis MY, Dreifuss RM. 1989. Evidence for a role of testosterone-androgen receptor interactions in mediating masculine sexual behavior in male rats. *Endocrinology.*; 124(2):618-26.

- McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, de Kretser DM, Pratis K, Robertson DM. 2002. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog Horm Res.*; 57:149-79.
- Mendelsohn FA, Quirion R, Saavedra JM, Aguilera G, Catt KJ. 1984. Autoradiographic localization of angiotensin II receptors in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 81(5):1575-9.
- Mohankumar PS, Mohankumar SM, Quadri SK, Voogt JL. 1997. Chronic hyperprolactinemia and changes in dopamine neurons. *Brain Res Bull.*; 42(6):435-41.
- Morishita R, Higaki J, Okunishi H, Nakamura F, Nagano M, Mikami H, Ishii K, Miyazaki M, Ogihara T. 1993. Role of tissue renin angiotensin system in two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Am J Physiol.*; 264(3 Pt 2):F510-4.
- Müller H, Schweitzer N, Jöhren O, Dominiak P, Raasch W. 2007. Angiotensin II stimulates the reactivity of the pituitary-adrenal axis in leptin-resistant Zucker rats, thereby influencing the glucose utilization. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*; 293(3):E802-10.
- Müller SC, el-Damanhoury H, Rüth J, Lue TF. 1991. Hypertension and impotence. *Eur Urol.*; 19(1):29-34.
- Munafo A, Christen Y, Nussberger J, Shum LY, Borland RM, Lee RJ, Waeber B, Biollaz J, Brunner HR. 1992. Drug concentration response relationships in normal volunteers after oral administration of losartan, an angiotensin II receptor antagonist. *Clin Pharmacol Ther.*; 51(5):513-21.

- Murphy AZ, Rizvi TA, Ennis M, Shipley MT. 1999. The organization of preoptic-medullary circuits in the male rat: evidence for interconnectivity of neural structures involved in reproductive behavior, antinociception and cardiovascular regulation. *Neuroscience.*; 91(3):1103-16.
- Naftolin F. 1981. Understanding the Bases of Sex Differences. *Science.*; Vol. 211, Number 4488.
- Navar LG, Zou L, Von Thun A, Tarrng Wang C, Imig JD, Mitchell KD. 1998. Unraveling the Mystery of Goldblatt Hypertension. *News Physiol.*; 13:170-176.
- Nelson RJ. 1995. Male Reproductive Behavior. In: An Introduction to Behavior Endocrinology. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Neumann J, Ligtenberg G, Klein IH, Boer P, Oey PL, Koomans HA, Blankestijn PJ. 2007. Sympathetic hyperactivity in hypertensive chronic kidney disease patients is reduced during standard treatment. *Hypertension.*; 49(3):506-10.
- Nishimura M, Milsted A, Block CH, Brosnihan KB, Ferrario CM. 1992. Tissue renin-angiotensin systems in renal hypertension. *Hypertension.*; 20(2):158-67.
- Nobre F, da Silva CA, Coelho EB, Salgado HC, Fazan R Jr. 2006. Antihypertensive agents have different ability to modulate arterial pressure and heart rate variability in 2K1C rats. *Am J Hypertens.*; 19(10):1079-83.
- Normandin JJ, Murphy AZ. 2011. Excitotoxic lesions of the nucleus paragigantocellularis facilitate male sexual behavior but attenuate female sexual behavior in rats. *Neuroscience.*; 175:212-23.
- Nyklíček I, Bosch JA, Amerongen AV. 2005. A generalized physiological hyperreactivity to acute stressors in hypertensives. *Biol Psychol.*; 70(1):44-51.

- O'Donnell AB, Araujo AB, McKinlay JB. 2004. The health of normally aging men: The Massachusetts Male Aging Study (1987-2004). *Exp Gerontol.*; 39(7):975-84.
- Oliveira M, Leão P, Rodrigues AJ, Pêgo JM, Cerqueira JJ, Sousa N. 2011. Programming Effects of Antenatal Corticosteroids Exposure in Male Sexual Behavior. *J Sex Med.* doi: 10.1111/j.1743-6109.2010.02170.x. (Epub ahead of print).
- Orth JM. 1993. Cell biology of testicular development in the fetus and neonate. In: Desjardins C, Ewing LL, eds. *Cell and Molecular Biology of the Testis*. New York: Oxford University. Press; 3–43.
- Padoin MJ, Cadore LP, Gomes CM, Barros HM, Lucion AB. 2001. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. *Behav Neurosci.*; 115(6):1332-40.
- Palmer AA, Steele MK, Shackelford RL, Ganong WF. 1994. Intravenous losartan inhibits the increase in plasma luteinizing hormone and water intake produced by intraventricular angiotensin II. *Proc Soc Exp Biol Med.*; 205(3):263-6.
- Pals DT, Couch SJ. 1993. Renin release induced by losartan (DuP 753), an angiotensin II receptor antagonist. *Clin Exp Hypertens.*; 15(1):1-13.
- Paredes RG, Highland L, Karam P. 1993. Socio-sexual behavior in male rats after lesions of the medial preoptic area: evidence for reduced sexual motivation. *Brain Res.*; 618(2):271-6.
- Paredes RG, Tzschentke T, Nakach N. 1998. Lesions of the medial preoptic area/anterior hypothalamus (MPOA/AH) modify partner preference in male rats. *Brain Res.*; 813(1):1-8.

- Pelisch N, Hosomi N, Ueno M, Nakano D, Hitomi H, Mogi M, Shimada K, Kobori H, Horiuchi M, Sakamoto H, Matsumoto M, Kohno M, Nishiyama A. 2011. Blockade of AT1 Receptors Protects the Blood-Brain Barrier and Improves Cognition in Dahl Salt-Sensitive Hypertensive Rats. *Am J Hypertens.*; 24(3):362-8.
- Petersson MJ, Rundqvist B, Johansson M, Eisenhofer G, Lambert G, Herlitz H, Jensen G, Friberg P. 2002. Increased cardiac sympathetic drive in renovascular hypertension. *J Hypertens.*; 20:1181–1187.
- Pickering TG. 1989. Renovascular hypertension: etiology and pathophysiology. *Semin Nucl Med.*;19(2):79-88.
- Quinlan JT, Phillips MI. 1981. Immunoreactivity for an angiotensin II-like peptide in the human brain. *Brain Res.*; 205(1):212-8.
- Raasch W, Wittmershaus C, Dendorfer A, Voges I, Pahlke F, Dodt C, Dominiak P, Jöhren O. 2006. Angiotensin II inhibition reduces stress sensitivity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis in spontaneously hypertensive rats. *Endocrinology.*; 147(7):3539-46.
- Reagan LP, Flanagan-Cato LM, Yee DK, Ma LY, Sakai RR, Fluharty SJ. 1994. Immunohistochemical mapping of angiotensin type 2 (AT2) receptors in rat brain. *Brain Res.*; 662(1-2):45-59.
- Reid IA, Morris BJ, Ganong WF. 1978. The renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol.*; 40:377-410.
- Rhees RW, Lephart ED, Eliason D. 2001. Effects of maternal separation during early postnatal development on male sexual behavior and female reproductive function. *Behav Brain Res.*; 123(1):1-10.

- Rivier C, Vale W. 1983. Effect of angiotensin II on ACTH release in vivo: role of corticotropin-releasing factor. *Regul Pept.*; 7(3):253-8.
- Rivier C, Rivier J, Vale W. 1986. Stress-induced inhibition of reproductive functions: role of endogenous corticotropin-releasing factor. *Science*; 231(4738):607-9.
- Robb GW, Amann RP, Killian GJ. 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fertil.*; 54(1):103-7.
- Rodríguez-Manzo G, Pellicer F, Larsson K, Fernández-Guasti A. 2000. Stimulation of the medial preoptic area facilitates sexual behavior but does not reverse sexual satiation. *Behav Neurosci.*; 114(3):553-60.
- Rosen RC. 1997. Sexual dysfunction as an obstacle to compliance with antihypertensive therapy. *Blood Press Suppl.*; 1:47-51.
- Rossi F, Ferraresi A, Romagni P, Silvestroni L, Santiemma V. 2002. Angiotensin II stimulates contraction and growth of testicular peritubular myoid cells in vitro. *Endocrinology.*; 143(8):3096-104.
- Ruiz-Ortega M, Ortis A. Angiotensin II and reactive oxygen species. 2005. *Antioxid Redox Signal.*; 7:1258–1260.
- Saavedra JM. 1992. Brain and pituitary angiotensin. *Endocr Rev.*; 13(2):329-80.
- Saavedra JM. 2005. Brain angiotensin II: new developments, unanswered questions and therapeutic opportunities. *Cell Mol Neurobiol.*; 25(3-4):485-512.
- Sánchez Torres G, Posadas C, Millán AJ, Gutiérrez Fuster E, Serrano Mass P, Rangel J, Cuéllar A. 1976. The renin-angiotensin-aldosterone system in the diagnosis of renovascular arterial hypertension. *Arch Inst Cardiol Mex.*; 46(2):198-212.

- Sasaki M, Fujimura A, Harada K, Sunaga K, Ebihara A. 1995. Effect of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, on response of cortisol and aldosterone to adrenocorticotrophic hormone. *J Clin Pharmacol.*; 35(8):776-9.
- Scaletta LL & Hull EM. 1990. Systemic or intracranial apomorphine increases copulation in long-term castrated male rats. *Pharmacol Biochem Behav.*; 37(3):471-5.
- Scheuer DA & Bechtold AG. 2001. Glucocorticoids potentiate central actions of angiotensin to increase arterial pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*; 280(6):R1719-26.
- Seltzer A, Tsutsumi K, Shigematsu K, Saavedra JM. 1993. Reproductive hormones modulate angiotensin II AT1 receptors in the dorsomedial arcuate nucleus of the female rat. *Endocrinology.*; 133(2):939-41.
- Sesayama S, Ishii N, Ishikura F, Kamijima G, Ogawa S, Kanmatsuse K, Kimoto Y, Sakuma I, Nonogi H, Matsumori A, Yamamoto Y. 2003. Men's Health Study: epidemiology of erectile dysfunction and cardiovascular disease. *Circ J.*; 67(8):656-9.
- Setchell BP. 1994. Possible physiological bases for contraceptive techniques in the male. *Hum Reprod.*; 9(6):1081-7.
- Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW. 1990. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol.*; 294(1):76-95.
- Simerly RB, Swanson LW. 1986. The organization of neural inputs to the medial preoptic nucleus of the rat. *Comp Neurol.*; 246(3):312-42.

- Simerly RB, Swanson LW. 1988. Projections of the medial preoptic nucleus: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin anterograde tract-tracing study in the rat. *J Comp Neurol.*; 270(2):209-42.
- Sirett NE, McLean AS, Bray JJ, Hubbard JI. 1977. Distribution of angiotensin II receptors in rat brain. *Brain Res.*; 122(2):299-312.
- Sirinathsinghji DJ, Rees LH, Rivier J, Vale W. 1983. Corticotropin-releasing factor is a potent inhibitor of sexual receptivity in the female rat. *Nature*; 305(5931):232-5.
- Skinner MK, Norton JN, Mullaney BP, Rosselli M, Whaley PD, Anthony CT. 1991. Cell-cell interactions and the regulation of testis function. *Ann N Y Acad Sci.*; 637:354-63.
- Song K, Zhuo J, Allen AM, Paxinos G, Mendelsohn FA. 1991a. Angiotensin II receptor subtypes in rat brain and peripheral tissues. *Cardiology.*; 79 Suppl 1:45-54.
- Song KF, Zhuo JL, Mendelsohn FA. 1991b. Access of peripherally administered DuP 753 to rat brain angiotensin II receptors. *Br J Pharmacol.*; 104(4):771-2.
- Spessoto LC, Cordeiro JA, de Godoy JM. 2010. Effect of systemic arterial pressure on erectile dysfunction in the initial stages of chronic arterial insufficiency. *BJU Int.*; 106(11):1723-5.
- Speth RC, Daubert DL, Grove KL. 1999. Angiotensin II: a reproductive hormone too? *Regul Pept.*; 79(1):25-40.
- Steele MK. 1992. The role of brain angiotensin II in the regulation of Luteinizing Hormone and Prolactin secretion. *Trends Endocrinol Metab.*; 3(8):295-301.

- Steele MK, McCann SM, Negro-Vilar A. 1982. Modulation by dopamine and estradiol of the central effects of angiotensin II on anterior pituitary hormone release. *Endocrinology*.; 111(3):722-9.
- Steele MK, Myers LS. 1990. In vivo studies on paracrine actions of pituitary angiotensin II in stimulating prolactin release in rats. *Am J Physiol*.; 258(4 Pt 1):E619-24.
- Steele MK, Negro-Vilar A, McCann SM. 1981. Effect of angiotensin II on in vivo and in vitro release of anterior pituitary hormones in the female rat. *Endocrinology*.; 109(3):893-9.
- Steele MK, Stephenson KN, Meredith JM, Levine JE. 1992. Effects of angiotensin II on LHRH release, as measured by in vivo microdialysis of the anterior pituitary gland of conscious female rats. *Neuroendocrinology*.; 55(3):276-81.
- Stephenson KN, Steele MK. 1992. Brain Angiotensin II Receptor Subtypes and the Control of Luteinizing Hormone and Prolactin Secretion in Female Rats *J.Neuroendocrinol.*; 4(4): 441-447.
- Stone CP. 1922. The Congenital Sexual Behavior of the Young Male Albino Rat. *J Comp Psychol*. Vol 2, Issue 2: 95-153.
- Sumitomo T, Suda T, Nakano Y, Tozawa F, Yamada M, Demura H. 1991. Angiotensin II increases the corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid level in the rat hypothalamus. *Endocrinology*.; 128(5):2248-52.
- Suzuki H, Tominaga T, Kumagai H, Saruta T. 1988. Effects of first-line antihypertensive agents on sexual function and sex hormones. *J Hypertens Suppl.*; 6(4):S649-51.

- Szczyпка MS, Zhou Q, Palmiter RD. 1998. Dopamine-stimulated sexual behavior is testosterone dependent in mice. *Behav Neurosci.*; 112:1229–1235.
- Tagliamonte A, Fratta W, Del Fiacco M, Gessa GL. 1974. Possible stimulatory role of brain dopamine in the copulatory behavior of male rats. *Pharmacol Biochem Behav.*; 2(2):257-60.
- Tedesco MA, Ratti G, Mennella S, Manzo G, Grieco M, Rainone AC, Iarussi D, Iacono A. 1999. Comparison of losartan and hydrochlorothiazide on cognitive function and quality of life in hypertensive patients. *Am J Hypertens.*; 12(11 pt1):1130–1134.
- Textor SC & Wilcox CS. 2001. Renal artery stenosis: a common, treatable cause of renal failure? *Annu Rev.*; 52:421-42.
- Tomita H, Egashira K, Ohara Y, Takemoto M, Koyanagi M, Katoh M, Yamamoto H, Tamaki K, Shimokawa H, Takeshita A. 1998. Early induction of transforming growth factor-beta via angiotensin II type 1 receptors contributes to cardiac fibrosis induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Hypertension.*; 32(2):273-9.
- Tong YC, Hung YC, Lin SN, Cheng JT. 1996. The norepinephrine tissue concentration and neuropeptide Y immunoreactivity in genitourinary organs of the spontaneously hypertensive rat. *J Auton Nerv Syst.*; 56(3):215-8.
- Tsutsumi K, Saavedra JM. 1991. Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT1 and AT2) in rat brain. *Am J Physiol.*; 261(1 Pt 2):R209-16.
- Tsunoda K, Abe K, Hagino T, Omata K, Misawa S, Imai Y, Yoshinaga K. 1993. Hypotensive effect of losartan, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, in essential hypertension. *Am J Hypertens.*; 6(1):28-32.

- Ulisse S, Fabbri A, Tinajero JC, Dufau ML. 1990. A novel mechanism of action of corticotropin releasing factor in rat Leydig cells. *J Biol Chem.*; 265(4):1964-71.
- Uresin Y, Erbas B, Ozek M, Ozkök E, Gürol AO. 2004. Losartan may prevent the elevation of plasma glucose, corticosterone and catecholamine levels induced by chronic stress. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*; 5(2):93-6.
- Ushiyama M, Morita T, Kuramochi T, Yagi S, Katayama S. 2004. Erectile dysfunction in hypertensive rats results from impairment of the relaxation evoked by neurogenic carbon monoxide and nitric oxide. *Hypertens Res.*; 27:253–261.
- Van Houten M, Schiffrin EL, Mann JF, Posner BI, Boucher R. 1980. Radioautographic localization of specific binding sites for blood-borne angiotensin II in the rat brain. *Brain Res.*; 186(2):480-5.
- Verhoeven G, Willems A, Denolet E, Swinnen JV, De Gendt K. 2010. Androgens and spermatogenesis: lessons from transgenic mouse models. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*; 365(1546):1537-56.
- Vieira AA, Nahey DB, Collister JP. 2010. Role of the organum vasculosum of the lamina terminalis for the chronic cardiovascular effects produced by endogenous and exogenous ANG II in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*; 299(6):R1564-71.
- Vinson GP, Mehta J, Evans S, Matthews S, Puddefoot JR, Saridogan E, Holt WV, Djahanbakhch O. 1996. Angiotensin II stimulates sperm motility. *Regul Pept.* 1996; 67(2):131-5.

- Vinson GP, Puddefoot JR, Ho MM, Barker S, Mehta J, Saridogan E, Djahanbakhch O. 1995. Type 1 angiotensin II receptors in rat and human sperm. *J Endocrinol.*; 144(2):369-78.
- Volpe M, Savoia C, De Paolis P, Ostrowska B, Tarasi D, Rubattu S. 2002. The renin-angiotensin system as a risk factor and therapeutic target for cardiovascular and renal disease. *J Am Soc Nephrol.*; Suppl 3:S173-8.
- Von Bohlen und Halbach O, Albrecht D. 1998a. Mapping of angiotensin AT1 receptors in the rat limbic system. *Regul Pept.*; 78(1-3):51-6.
- Von Bohlen und Halbach O, Albrecht D. 1998b. Visualization of specific angiotensin II binding sites in the rat limbic system. *Neuropeptides.*; 32(3):241-5.
- Warner RK, Thompson JT, Markowski VP, Loucks JA, Bazzett TJ, Eaton RC, Hull EM. 1991. Microinjection of the dopamine antagonist cis-flupenthixol into the MPOA impairs copulation, penile reflexes and sexual motivation in male rats. *Brain Res.*; 540(1-2):177-82.
- Wood RI. 1997. Thinking about networks in the control of male hamster sexual behavior. *Horm Behav.*; 32(1):40-5.
- Vieira AA, Nahey DB, Collister JP. 2010. Role of the organum vasculosum of the lamina terminalis for the chronic cardiovascular effects produced by endogenous and exogenous ANG II in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*; 299(6):R1564-71.
- Welsh M, Saunders PT, Atanassova N, Sharpe RM, Smith LB. 2009. Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *FASEB J.* 23, 4218–4230.

- Weir MR. 2006. Providing end-organ protection with renin-angiotensin system inhibition: the evidence so far. *J Clin Hypertens.* (Greenwich);8(2):99-105.
- Widdop RE, Li XC. 1997. A simple versatile method for measuring tail cuff systolic blood pressure in conscious rats. *Clin Sci.* (Lond).; 93(3):191-4.
- Williams B. 2010. The year in hypertension. *J Am Coll Cardiol.*; 55(1):65-73.
- Wood RI. 1997. Thinking about networks in the control of male hamster sexual behavior. *Horm Behav.*; 32(1):40-5.
- Zalba G, Beaumont J, San Jose G, Fortuno A, Fortuno MA, Diez J. 2000. Vascular oxidant stress: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol Biochem.*; 56: 57–64.
- Zamir N, Ben-Ishay D, Wiedefeld J, Siegel RA. 1983. Stress-induced secretion of adrenocorticotropin, corticosterone, and prolactin in experimentally and genetically hypertensive rats. *Endocrinology.*;112(2):580-5.
- Zhu GQ, Xu Y, Zhou LM, Li YH, Fan LM, Wang W, Gao XY, Chen Q. 2009. Enhanced cardiac sympathetic afferent reflex involved in sympathetic overactivity in renovascular hypertensive rats. *Exp Physiol.*; 94(7):785-94.
- Zimmerman MC, Dunlay RP, Lazartigues E, Zhang Y, Sharma RV, Engelhardt JF, Davisson RL. 2004. Requirement for Rac1-dependent NADPH oxidase in the cardiovascular and dipsogenic actions of angiotensin II in the brain. *Circ Res.*; 95: 532–539.
- Zipf WB, Payne AH, Kelch RP. 1978. Prolactin, growth hormone, and luteinizing hormone in the maintenance of testicular luteinizing hormone receptors. *Endocrinology.*; 103(2):595-600.

CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

From: esubmissionsupport@elsevier.com
To: karin viana weissheimer
Date: Tue, 12 Apr 2011 01:30:23 +0100
Subject: Submission Confirmation

Dear Karin,

Your submission entitled "Temporal analysis of reproductive function in a male rat model of two-kidney, one-clip hypertension" has been received by Physiology & Behavior

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/phb/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Physiology & Behavior

For further assistance, please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Temporal analysis of reproductive function in a male rat model of two-kidney, one-clip hypertension

Karin Viana Weissheimer, Aldo Bolten Lucion, Gilberto Luiz Sanvito *

Department of Physiology of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

Corresponding author: Laboratório de Neuroendocrinologia do Comportamento, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS) 90050-170, Brazil.

Tel.: +55 51 33083359; fax: +55 51 33083656.

E-mail address: karinvweishh@hotmail.com (K.V. Weissheimer).

Abstract

There is an association between hypertension and reproductive dysfunction. The angiotensin II (AngII) is involved in hypertension pathogenesis and in the reproduction function regulation. The present study aimed to analyze the temporal evolution of hypertension effects on rat reproductive function submitted to a two-kidney, one-clip (2K1C) model. Sexual behavior parameters, gametogenesis and plasmatic concentrations of Ang II, luteinizing hormone

(LH), testosterone, prolactin and corticosterone of male rats from groups at 7, 14, and 21 days after 2K1C model or sham surgery were evaluated. All rats subjected to 2K1C model showed an increase in plasma Ang II and a hypertensive response, when compared to their respective control groups. Plasma LH decreased only in the 7 days after 2K1C model-group and it was elevated in the 21 days after 2K1C model-group. Plasma prolactin increased in hypertensive groups at 14 and 21 days groups. On the other hand, there were no changes in plasma testosterone and corticosterone in any group. All hypertensive animals showed inhibition of one or more sexual behavior parameters, and the temporal advancement of hypertension promoted a greater impairment in this function. The 21 days after 2K1C model group showed spermatogenesis dysfunction. The results of this research suggest that plasma Ang II elevation probably represents one of the major factors of early sexual behavior impairment and reproductive hormones changing in 2K1C model. In addition, the combined effects of plasma Ang II, prolactin and LH increases seems to contribute to the spermatogenesis and sexual dysfunction in rats submitted to longer period of renovascular hypertension.

Key words: two-kidney one-clip hypertension, angiotensin II, reproductive function, sexual behavior, spermatogenesis.

1. Introduction

Normal reproductive function requires the integration of several physiological mechanisms, involving: central and peripheral nervous systems, cardiovascular system, pituitary, and reproductive organs [1]. Hypertension is a risk factor for sexual dysfunction [2] and various antihypertensive drugs can contribute for erectile function damaging in male [3]. However, the mechanisms underlying reproductive dysfunction associated with hypertension remains poorly understood.

The angiotensin II (Ang II) is a peptide which plays an important role in the hypertension pathogenesis [4, 5] and also is involved with regulation of reproduction function [6]. Some studies indicate that central Ang II has an inhibitory role in the modulation of male rats' sexual behavior [7]. Our laboratory reported that the microinjection of Ang II into the medial amygdaloid nucleus decreased sexual behavior in male rats [8]. Besides that, rats submitted to the 2K1C model had sexual behavior and spermatogenesis impaired after twenty-eight days of hypertension [9]. In fact, Ang II acts on testicular function, modifying the seminiferous tube contraction [10] and could be involved in the inhibition of spermatogenesis.

Studies have indicated that the Ang II effects on cardiovascular and reproductive functions are mainly mediated through AT1 receptors [11, 12]. Therefore, specific Ang II type I receptor (AT1) antagonists are potentially a useful treatment for hypertension [13, 14] and for improving sexual dysfunction in hypertensive patients [15].

Ang II can modulate the reproductive function by affecting the expression of reproduction's hormonal regulators, such as prolactin, gonadotrophins and

corticosterone [6, 16-19]. However, the interaction effects among Ang II and these hormones on reproduction need to be better investigated.

This study used the 2K1C model attempting to clarify the mechanisms involved in sexual behavior and spermatogenesis impairment of hypertensive rats. It aimed to investigate the chronological evolution of changes in the endocrine system and sexual behavior of rats subjected to the 2K1C model, in order to identify the sexual dysfunction and infertility's installation, development and, thus, obtain evidence of major neuroendocrine factors involved in the pathogenesis of reproductive function.

2. Materials and Methods

All procedures used in this study followed the guidelines for the care and use of Laboratory Animals from the National Institute of Health and were approved by Ethics Committee in Research of the Federal University of Rio Grande do Sul (Protocol # 13434).

2.1 Animals

Male Wistar rats, three months old, were obtained from the colony maintained in the Federal University of Rio Grande do Sul Laboratory Animal Facility. Animals were kept on a 12-hr light/dark cycle (lights off at 18:00 hr) and in a stable environmental temperature (21°C) with ad-lib access to rat chow (Nutrilab, Colombo, Brazil) and water. Female Wistar rats, 3 months old, were used to record male sexual behavior. The females were gonadectomized and induced to sexual receptiveness by a sequential subcutaneous injection of 20 µg of estradiol (Benzo-ginoestril, Sanofi, São Paulo, Brazil) 48 h, and 20 µg of

estradiol plus 500 µg of progesterone (4-Pregnene-3,20-dione, Sigma, St. Louis, MO) 6 h before testing. Previous to surgery for renal clip, males were selected for sexual behavior and only those with at least 6 intromission behaviors in a 10-min test were used.

2.2 Experimental Groups

In all experimental groups we evaluated the reproductive function of 2K1C hypertensive male rats and compared to reproductive function of sham male rats both submitted to same period from surgical procedure. Rats were divided in 6 groups after 7, 14 and 21 days from 2K1C or sham-surgery: 7 days groups - Sham (n=10) and 2K1C (n=10); 14 days groups - Sham (n=10) and 2K1C (n=10); 21 days groups - Sham (n=10) and 2K1C (n=10). The male sexual behavior was recording at night before decapitation and the systolic blood pressure was recording at least 3 hour before decapitation. In each group, animals were death after 7, 14 or 21 days from surgical procedure. The kidneys and testes were excised and weighed. The testes were frozen for the posterior spermatogenesis analysis.

2.3 Surgical procedures

Two-kidney, one-clip model was employed in male rats weighing from 290 to 330 g (n= 30). These animals were anesthetized with a ketamine-xylazine mixed cocktail (100 mg/kg ip ketamine, 50 mg/kg ip xylazine) for the surgical procedures. The left renal artery was isolated, and a small segment was dissected free of the renal vein to put a silver clip (internal diameter 0.20

mm) around the main renal artery. As controls, sham-operated rats (n= 30) underwent the same surgical procedure without receiving the clip.

2.4 Arterial pressure recording

Systolic blood pressure (SBP) was indirectly measured (tail-cuff method) with a pressure transducer connected to a Kent Scientific system (RTBP 1001 Rat Tail Blood Pressure System; Litchfield, USA) and recordings were quantified using the WinDaq Data Acquisition Software (DATAQ Instruments Inc., Akron, Ohio, USA). Only 2K1C rats with SAP more than 150 mmHg were included in the protocols.

2.5 Reproductive Function

2.5.1 Male Sexual Behavior

Sexually experienced adult males had recorded their sexual behavior 1–2 hr after the beginning of the dark phase. Each male was habituated to the cage observation for 15 min before behavioral recording. After this period, a sexually receptive female was introduced into the observation cage, and the behavior was videotaped. The following parameters of the male's behavior were recorded: latency to the first intromission, the time (seconds) from the introduction of the female in the cage up to the first intromission; frequency of intromissions, the number of intromissions; and the latency to ejaculation, the time (seconds) from the first intromission of a series up to the first ejaculation [20]. The animals were videotaped until the ejaculation latency or a maximum of 30 min if no ejaculation was observed and then the test was finished. The intromission latency and frequency of intromissions were analyzed in the first 10

min of the 30 min recording period. When the frequency of intromissions was zero, the intromission latency was considered 600 s. In rats that did not show intromission, the ejaculation latency was considered 1800 s. The number of animals showing mounts, intromissions, and ejaculation was registered [8, 9].

Stimulus females were ovariectomized rats brought into sexual receptiveness by subcutaneous injections of estradiol benzoate (20 mg/rat) and progesterone (500 mg/rat) plus estradiol benzoate (20 mg/rat) 48 and 6 hr before the test, respectively. All females were first tested with nonexperimental sexually active males and only those proven to be lordotic were used.

2.5.2 Spermatogenesis

All rats had their right testis analyzed for measurement of the spermatids quotient (SQ) (number of the spermatids $\times 10^6$) and epididymides transit (ET) (transit time/days for the maturation of the sperm in epididymides). The testes were weighed, homogenized and sonicated in 8 ml of a T-X solution (NaCl .9% and Triton X-100 .05%). Portions of 100 ml of the homogenate were diluted in 900 ml of the T-X solution. Homogenization-resistant testicular spermatids in the testes and sperm in the caput/corpus epididymidis and cauda epididymidis were enumerated in Neubauer chambers. Daily sperm production per testis was determined by dividing the total number of homogenization-resistant spermatids per testis by 6.1 days (the number of days of a seminiferous cycle in which these spermatids are present). Transit times through the caput/corpus epididymidis and cauda epididymidis were calculated by dividing the number of sperm within each of these regions by the daily sperm production [9].

2.6 Plasma hormones

2.6.1 Enzyme linked immunoassay (ELISA)

The plasma concentration of Ang II was measured by ligand ELISA kits. We collected the animal's trunk blood in ependorfs containing a cocktail protease inhibitor (Sigma). Blood samples were centrifuged at 3.000 rpm for 20 min at 4 °C. Each plasma sample was then transferred into a test-tube and stored at -80 °C. Then, plasma concentration of Ang II was measured using a commercial *Angiotensin II kit* – EIA (Peninsula Laboratories Inc., San Carlos, USA) with a lower detection limit of 0.02-0.04 ng/mL.

2.6.2 Radioimmunoassay (RIA)

The plasma concentrations of LH, prolactin, testosterone and corticosterone (ng/mL) were measured by RIA. Trunk blood was collected, centrifuged at 3.000 rpm for 20 min at 4 °C. Each plasma sample was then transferred into a test-tube and stored at -80 °C for hormone assays. Plasma concentration of LH and prolactin (ng/mL) were performed using specific kits provided by the pelo National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive and Kidney Diseases - NIDDK (Baltimore, MD, USA). The lower detection limit was of 0.05 ng/mL to LH and 0.09 ng/mL to prolactin. The plasma samples for testosterone dosage underwent an extraction process with distilled ethylic ether. The testosterone dosage was performed using a tritiated hormone (1,2,6,7-³H testosterone) acquired from New England Nuclear (USA), a testosterone standard and specific antibody acquired from Sigma (USA). The separation of the free and bound fractions was done by dextran-coal. The detectable minimum doses were 0.03 ng/mL. Also the plasma samples for corticosterone

dosage underwent an extraction process with distilled ethylic ether. The plasma concentration of corticosterone was measured using a corticosterone standard and specific antibody acquired from Sigma (USA) and corticosterone tricia from Amersham (USA). The detectable minimum doses were 0.2 ng/mL. To each hormone, all samples were dosed in duplicate in one assay.

2.7 Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM, except for the latency data (sexual behavior), where median (interquartile interval) was used and analyzed by non parametric Mann-Whitney test. All other data were analyzed using Student's t-test. The factors analyzed were compared between clipping renal artery versus sham surgery for each group animals. The percentage of animals that ejaculated was analyzed using the Chi square test. In all cases the level of significance was set at $P < 0.05$.

3. Results

3.1 Systolic blood pressure (SBP)

Figure 1 shows the increase in mean SBP in the 2K1C rats as compared with sham rats for each group ($P < 0.05$). The 2K1C rats presented a significant increase in mean SBP (mmHg) at 7 days after surgery. The SBP response was persistently elevated in similar range throughout the 14 and 21 days ($P < 0.05$).

3.2 Plasma hormones

Table 1 shows the plasma Ang II, LH, testosterone, prolactina and corticosterone concentrations (ng/mL). The comparisons were performed

between 2K1C rats and rats submitted to sham surgery for each group. There was a significant increase in plasma Ang II at 7, 14 and, 21 days after 2K1C surgery ($P<0.05$). Plasma LH was reduced only at 7 days after 2K1C surgery, no changed at 14 days, but increased at 21 days after 2K1C surgery ($P<0.05$). Plasma testosterone had no significant changes at 7, 14 and, 21 days groups. Plasma prolactin no changed at 7 days, but increased at 14 and 21 days after 2K1C surgery ($P<0.05$). Plasma corticosterone had no significant changes at 7, 14 and, 21 days groups.

3.3 Reproductive Function

3.3.1 Male sexual behavior

Table 2 shows the renovascular hypertension effects on sexual behavior of male rats after 7, 14 or 21 days of sham or 2K1C surgery. The comparisons were performed between 2K1C rats and rats submitted to sham surgery for each group. Hypertensive rats present a reduction of frequency of intromissions at 7, 14 and 21 days after 2K1C surgery. The intromission latency and ejaculation latency were increased on 14 and 21 days after 2K1C surgery, but no changed at 7 days. All animals presented ejaculation at 7 days, but at 14 days and 21 days after surgery, 90% and 80% of 2K1C rats presented ejaculation, respectively.

3.3.2 Spermatogenesis

Figure 2 shows the quotient of spermatids (number $\times 10^6$) in each group. There was a reduction of spermatids quotient at 21 days, but no change at 7 and 14 days, when 2K1C rats were compared with sham rats ($P<0.05$). Figure 3 shows the epididymal transit (number of days) in each group. One increase of

epididymal transit was observed in 2K1C rats at 21 days, but there were not changes at 7 and 14 days ($P < 0.05$).

4. Discussion

The results of the present study showed that the 2K1C model induced hypertension in all groups and the plasma Ang II progressively increased throughout experimental period, from 7 to 21 days. The plasma LH analysis showed dual response, presenting a reduction at 7 days and an increase at 21 days after 2K1C surgery. There was an increase in plasma prolactin on the last periods at 14 and 21 days after 2K1C surgery, but plasma testosterone and corticosterone did not alter in any group. The hypertensive rats showed early reduction of the sexual behavior and a spermatogenesis damage only 21 days after 2K1C surgery. Together these data illustrate that 2K1C male rat hypertension model produced an inhibition of the reproductive function and the longer hypertension duration caused greater impairment on reproduction.

In the 2K1C model the hypertension is induced by renal artery unilateral stenosis. The reduced renal perfusion pressure stimulates increased renin synthesis, which induces producing Ang II. Circulating Ang II increases total peripheral resistance and raises blood pressure [21]. In our study the plasma Ang II increasing was progressed with longer duration of hypertension. These increases in plasma Ang mark the first phase of the renovascular hypertension, which is dependent of both peripheral and central Ang II [22, 23]. Besides that, Ang II is present in neural sites that act on blood pressure control, such as the nucleus of the solitary tract [24], subfornical organ [25], rostral ventrolateral medulla (RVLM) and paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) [26, 27]. In addition, we show that 2K1C model induced similar increase levels in

systolic blood pressure among groups. These data are in agreement with previous studies that indicate hypertensive response stabilization between 1 and 11 weeks after 2K1C surgery in a murine model [28].

In our study we observed that the hypertension duration increasing compounded the damage to sexual behavior parameters analyzed, since hypertensive rats from all groups showed a reduced frequency of intromissions, and rats at 14 and 21 days showed greater intromission and ejaculation latencies. In addition, few hypertensive animals showed ejaculation at 21 days compared at 14 days. In fact, intromission and ejaculation abilities are indicators of erectile function integrity in rats [11, 12]. These data indicate a temporal association between plasma Ang II increasing and the aggravation of damage in the erectile function of hypertensive rats. The renin-angiotensin systems (RAS) interact with reproductive function in central and peripheral levels. The action of Ang II in the nervous system can be exerted by the peptide produced locally in the brain as well as by peripheral Ang II through the circumventricular organs [29, 30]. The presence of Ang II, detected by immunohistochemistry, and Ang II receptors, detected by in situ hybridization and binding techniques, has been found in brain areas that exert control on reproductive function [31, 32]. These brains areas, such as the medial preoptic area (MPOA) and medial amygdaloid nucleus (MeA) [33, 34] support the participation of Ang II in sexual behavior. In this direction, previous data indicated that Ang II inhibited sexual behavior when injected into the brain [7], involving AT1 and AT2 receptors [8, 11], and also in hypertensive rats submitted to the 28 days clipping procedure [9]. It is important to consider that pathogenesis of sexual dysfunction associated with hypertension may be multifactorial. Ang II is physiologically involved in the

initiation of penile detumescence in men [35] and the therapy using AT1 receptors antagonists have been associated with the ability of maintaining adequate erection and satisfactory sexual performance in the patients [15]. Impaired penile arterial function has been shown in impotent patients with hypertension [36, 37]. In hypertensive rats, the increase in genitourinary organs' sympathetic function may be contributive for erectile dysfunction [38].

Researches evidenced that Ang II plays excitatory role in the regulation of GnRH secretion [17, 39]. The MPOA is involved in the control of the gonadotropins cyclic release and data showed an increased cell discharge frequency upon Ang II administration [40]. There is evidence that the increase in GnRH secretion induced by Ang II is due to the increased release of norepinephrine in MPOA [6]. Ang II increases plasma LH when administered intraventricularly in ovariectomized rats treated with estrogen and progesterone [18]. On the other hand, in ovariectomized rats without ovarian steroids replacement and in male rats, intraventricular Ang II inhibits LH secretion [6]. We hypothesized that when plasma Ang II presents a small increase like on 7 days after 2K1C surgery, it acts centrally to reduce the LH release. However, when hypertensive rats show a great increase in plasma Ang II, evidenced 21 days after 2K1C surgery, this peptide acts centrally stimulating GnRH secretion and, consequently induce the increasing of LH release. In this study, we propose a central dual effect of Ang II on LH secretion, which is dependent of Ang II plasmatic concentration. Peripherally, it is important to consider the role of Ang II on LH function. Data suggest that Ang II acts on Leydig cells to inhibit the LH stimulation of testosterone production [41]. The stimulation of Ang II receptors in Leydig cells inhibits the gonadotropins ability of stimulating

testosterone production, through inhibition of the cAMP pathway [41]. It could be observed that there was a tendency to reduce plasma testosterone after 21 days hypertension, when plasma Ang II is higher and LH seems to reduce the Leydig cells' testosterone secretion ability of inducing. In this direction, previous data from our group showed a significant decrease in plasma testosterone after 28 days hypertension [9].

There are evidences that Ang II has a dual role in prolactin secretion. In anterior pituitary, Ang II stimulates prolactin release directly in the lactotroph [42, 43], while in arcuate nucleus, Ang II exerts an inhibitory effect [19, 44]. The Ang II inhibitory effect on prolactin release is mediated by an increased dopamine release into the pituitary portal blood system through its excitatory action on the tuberoinfundibular dopaminergic (TIDA) neurons [44]. The actions of Ang II, both in pituitary and in arcuate nucleus, are mediated by AT1 receptors (19, 32, 42, 45). In the present study, there was an increase in plasma prolactin, probably due the predominantly stimulatory effect of Ang II on pituitary, by AT1 receptors. A partial desensitization could also have occurred in this research, and the remaining effect of elevated plasma Ang II on prolactin secretion at 14 and 21 days after 2K1C surgery could explain the increase of plasma prolactin compared with control. Previous data show that Ang II induces an incomplete homologous desensitization of prolactin release in cultured pituitary cells [46]. The combine increases in plasma Ang II and prolactin, could explain the great impairment of sexual behavior in 2K1C animals from 14 and 21 days groups. Since, clinical and experimental data indicate that prolactin is involved in reproduction function regulation [47-49]. Prolactin receptors expression of in the MPOA and arcuate nucleus confirm the hypothesis that

prolactin participates in reproduction function [50]. Acute changes of plasma prolactin have been implicated in male sexual behavior modulating [51]. The sexual behavior facilitation can be due to the stimulation of dopamine turnover in nigrostriatal and mesolimbic systems, activating copulation, while in the MPOA, dopamine controls the genital reflexes, copulatory patterns, and sexual motivation [52]. On the other hand, chronic hyperprolactinemia is related to sexual dysfunction in man and rats [53, 54], whereas the prolonged stimulation of central dopamine transmission can lead hyposensitivity or down regulation of dopamine receptor systems [55], causing sexual dysfunction.

Previous studies have shown that Ang II induces corticotropin-releasing factor (CRF), adreno-cortico-trophic hormone (ACTH), and corticosterone secretion [16, 56, 57]. However, our data showed no changes in plasma corticosterone after 2K1C surgery, despite increases of plasma Ang II. This result is in agreement with findings in which rats treated during 4 weeks systemically with exogenous angiotensin have not changed basal levels of corticosterone [58]. Some clinical studies showed that urinary cortisol unchanged in hypertensive when compared to normotensive subjects [59]. Although, other clinical data indicates increasing in salivary cortisol of hypertensive patients [60]. The results of our study suggest the activation of compensatory mechanisms on higher plasma Ang II levels, preventing increases in plasma corticosterone of 2K1C animals. It is speculated that Ang II stimulates the PVN synthesizing CRF, but the corticosterone increased levels would be prevented by feedback inhibitory pathways activation on the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis, which has receptors for Ang II [33]. In this case, areas such as hippocampus would inhibit the HPA axis and,

consequently, prevent the increase in corticosterone levels. In this context, authors identified the action of RAS on the hippocampus of hypertensive rats, mediating cognitive responses [61].

Spermatogenesis was reduced after 21 days of 2K1C surgery. These hypertensive rats presented a reduction of spermatids quotient and an increased epididymal transit, suggesting a deficit in daily sperm production, maturation or in epididymal sperm storage capacity. This result is according with previous data in our group that found the similar alteration in hypertensive rats after 28 days of 2K1C surgery [9]. The presence of functional Ang II receptors in rat testis and epididymis supports its involvement in gonad function. The rat testis contains high affinity Ang II receptor binding sites [41] localized in the Leydig cells. In the epididymis, the Ang II receptor binding appeared to be localized in the smooth muscle layer as well as in the epithelium [62]. Seminiferous tubules contraction is important for spermatogenesis regulation and testicular sperm output. *In vitro* studies showed that Ang II, by AT1 receptors, induced a rise in intracellular calcium, growth and contraction in rat peritubular myoid cells [10].

In addition, prolactin seems to be involved in spermatogenesis. Quantitative RT-PCR and *in situ* hybridization detected the expression of prolactin in Leydig cells and in spermatogonia, suggesting that prolactin participates in mice spermiogenesis and spermatogenesis process [63]. Also, there are prolactin receptors in rat Sertoli cells [64]. Therefore, the hyperprolactinemia alters the mechanism of chromatin condensation during rats' spermiogenesis, causing a decrease in spermatozoids quality and inducing to infertility [49]. Prolactin can control the testicular function through other ways:

acting directly on pituitary, where inhibits LH and FSH synthesis [65], or on testis, regulating the testosterone synthesis induced by LH [66]. Then, we propose that plasma prolactin increase contributes for delaying the spermatids maturation and modifies LH action on testis.

It is important to consider the participation of vascular damage in hypertensive rats' spermatogenesis decrease. Studies in hypertensive spontaneously rats suggest that the decline in Sertoli cells functions is a result of hypertensive vascular changes involving the spermatids number reduction of these animals [66, 67].

In conclusion, these results point toward the major role of the Ang II on impairment of the reproduction, since only Ang II was altered in all periods of hypertension. The progressive elevations in plasma Ang II associated with plasma LH alterations and prolactin plasma concentrations increased in hypertensive rats contribute to the damage of sexual behavior. Plasma Ang II, prolactin and LH increase produce spermatogenesis inhibition in longer hypertension duration.

Acknowledgements

We thank Prof. Dr. Celso R. Franci (FMRP-USP) and Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira (PUCRS) for technical assistance. The authors are indebted to CAPES for financial support.

References

- [1] Speth RC, Daubert DL, Grove KL. Angiotensin II: a reproductive hormone too? *Regul Pept.*; 1999, 79(1):25-40.
- [2] Manolis A, Doulas M. Sexual dysfunction: the 'prima ballerina' of hypertension-related quality-of-life complications. *J Hypertens.*; 2008, 26(11):2074-84.
- [3] Ferrario CM, Levy P. Sexual Dysfunction in Patients with Hypertension: Implications for Therapy. *J Clin Hypertens.*; 2002, 4:424–432.
- [4] Reid IA, Morris BJ, Ganong WF. The renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol.*; 1978, 40:377-410.
- [5] Fitzsimons JT. Angiotensin stimulation of the central nervous system. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.*; 1980, 87:117-67.
- [6] Ganong WF. Reproduction and the renin-angiotensin system. *Neurosci Biobehav Rev.*; 1995, 19(2):241-50.
- [7] Clark JT. A possible role for angiotensin II in the regulation of male sexual behavior in rats. *Physiol. Behav.*; 1988, 45:221–224.
- [8] Breigeiron MK, Morris M, Lucion AB, Sanvitto GL. Effects of angiotensin II microinjected into medial amygdala on male sexual behavior in rats. *Horm Behav.*; 2002, 41(3):267-74.
- [9] Breigeiron MK, Lucion AB, Sanvitto GL. Effects of renovascular hypertension on reproductive function in male rats. *Life Sci.*; 2007, 80(17):1627-34.
- [10] Rossi F, Ferraresi A, Romagni P, Silvestroni L, Santemma V. Angiotensin II stimulates contraction and growth of testicular peritubular myoid cells in vitro. *Endocrinology.*; 2002, 143(8):3096-104.

- [11] Keaton AK, Clark JT. Effects of angiotensin II on sexual function, blood pressure, and fluid intake are differentially affected by AT-1 receptor blockade. *Physiol Behav.*; 1998, 64(3):339-46.
- [12] Chan P, Liu JC, Tong YC, Chen YJ, Wang CC, Tomlinson B, Cheng JT. Effects of losartan on the sexual behavior of male rats. *Pharmacology.*; 1999, 58(3):132-9.
- [13] Chiu AT, McCall DE, Price WA, Wong PC, Carini DJ, Duncia JV, Wexler RR, Yoo SE, Johnson AL, Timmermans PB. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. VII. Cellular and biochemical pharmacology of DuP 753, an orally active antihypertensive agent. *J Pharmacol Exp Ther.*; 1990, 252(2):711-8.
- [14] Tsunoda K, Abe K, Hagino T, Omata K, Misawa S, Imai Y, Yoshinaga K. Hypotensive effect of losartan, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, in essential hypertension. *Am J Hypertens.*; 1993, 6(1):28-32.
- [15] Della Chiesa A, Pfiffner D, Meier B, Hess OM. Sexual activity in hypertensive men. *J Hum Hypertens.*; 2003, 17(8):515-21.
- [16] Rivier C, Vale W. Effect of angiotensin II on ACTH release in vivo: role of corticotropin-releasing factor. *Regul Pept.*; 1983, 7(3):253-8.
- [17] Steele MK. The role of brain angiotensin II in the regulation of Luteinizing Hormone and Prolactin secretion. *Trends Endocrinol Metab.*; 1992, 3(8):295-301.
- [18] Dornelles RC, Franci CR.. Action of AT1 subtype angiotensin II receptors of the medial preoptic area on gonadotropins and prolactin release. *Neuropeptides.*; 1998, 32(1):51-5.
- [19] Donadio MV, Sagae SC, Franci CR, Anselmo-Franci JA, Lucion AB, Sanvitto GL. Angiotensin II receptors in the arcuate nucleus mediate stress-

induced reduction of prolactin secretion in steroid-primed ovariectomized and lactating rats. *Brain Res.*; 2004, 1006(1):59-65.

[20] Agmo A. Male rat sexual behavior. *Brain Res. Protoc.*; 1997, 1(2):203-9.

[21] Pickering TG. Renovascular hypertension: etiology and pathophysiology. *Semin Nucl Med.*; 1989, 19(2):79-88.

[22] Mann JF, Phillips MI, Dietz R, Haebara H, Ganten D. Effects of central and peripheral angiotensin blockade in hypertensive rats. 1978, *Am J Physiol.*; 234(5):H629-37.

[23] Guan S, Fox J, Mitchell KD, Navar LG. Angiotensin and angiotensin converting enzyme tissue levels in two-kidney, one clip hypertensive rats. *Hypertension*; 1992, 20(6):763-7.

[24] Plunkett LM, Saavedra JM. Increased angiotensin II binding affinity in the nucleus tractus solitarius of spontaneously hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 1985, 82(22):7721-4.

[25] Hendel MD, Collister JP. Contribution of the subfornical organ to angiotensin II-induced hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*; 2005, 288(2):H680-5.

[26] Campos RR, Bergamaschi CT. Neurotransmission alterations in central cardiovascular control in experimental hypertension. *Curr Hypertens Rev.*; 2006, 2: 193–198.

[27] Campos RR, Oliveira-Sales EB, Nishi EE, Boim MA, Dolnikoff MS, Bergamaschi CT. The role of oxidative stress in renovascular hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*; 2011, 38(2):144-52.

[28] Cheng J, Zhou W, Warner GM, Knudsen BE, Garovic VD, Gray CE, Lerman LO, Platt JL, Romero JC, Textor SC, Nath KA, Grande JP. Temporal

analysis of signaling pathways activated in a murine model of two-kidney, one-clip hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol.*; 2009, 297(4):F1055-68.

[29] Mangiapane ML, Simpson JB. Subfornical organ: forebrain site of pressor and dipsogenic action of angiotensin II. *Am J Physiol.*; 1980, 239(5):R382-9.

[30] Vieira AA, Nahey DB, Collister JP. Role of the organum vasculosum of the lamina terminalis for the chronic cardiovascular effects produced by endogenous and exogenous ANG II in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*; 2010, 299(6):R1564-71.

[31] Lind RW, Swanson LW, Ganten D. Organization of angiotensin II immunoreactive cells and fibers in the rat central nervous system. An immunohistochemical study. *Neuroendocrinology.*; 1985, 40(1):2-24.

[32] Jöhren O, Imboden H, Häuser W, Maye I, Sanvitto GL, Saavedra JM. Localization of angiotensin-converting enzyme, angiotensin II, angiotensin II receptor subtypes, and vasopressin in the mouse hypothalamus. *Brain Res.*; 1997, 757(2):218-27.

[33] Von Bohlen und Halbach O, Albrecht D. Mapping of angiotensin AT1 receptors in the rat limbic system. *Regul Pept.*; 1998, 78(1-3):51-6.

[34] Von Bohlen und Halbach O, Albrecht D. Visualization of specific angiotensin II binding sites in the rat limbic system. *Neuropeptides.*; 1998, 32(3):241-5.

[35] Becker AJ, Uckert S, Stief CG, Truss MC, Machtens S, Scheller F, Knapp WH, Hartmann U, Jonas U. Possible role of bradykinin and angiotensin II in the regulation of penile erection and detumescence. *Urology.*; 2001, 57(1):193-8.

[36] Müller SC, el-Damanhoury H, Rüth J, Lue TF. Hypertension and impotence. *Eur Urol.*; 1991, 19(1):29-34.

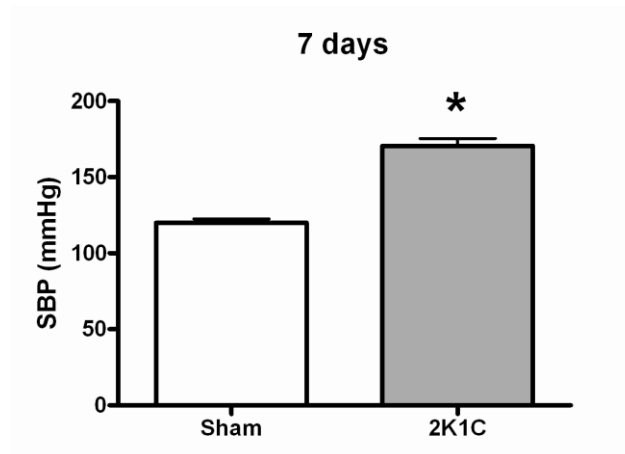
- [37] Kochar MS, Mazur LI, Patel A. What is causing your patient's sexual dysfunction? Uncovering a connection with hypertension and antihypertensive therapy. *Postgrad Med.*; 1999, 106(2):149-52, 155-7.
- [38] Tong YC, Hung YC, Lin SN, Cheng JT. The norepinephrine tissue concentration and neuropeptide Y immunoreactivity in genitourinary organs of the spontaneously hypertensive rat. *J Auton Nerv Syst.*; 1996, 56(3):215-8.
- [39] Ganong WF. Blood, pituitary, and brain renin-angiotensin systems and regulation of secretion of anterior pituitary gland. *Front Neuroendocrinol.*; 1993, 14(3):233-49.
- [40] Gronan RJ, York DH. Effects of angiotensin II and acetylcholine on neurons in the preoptic area. *Brain Res.*; 1978, 154(1):172-7.
- [41] Khanum A, Dufau ML. Angiotensin II receptors and inhibitory actions in Leydig cells. *J Biol Chem.*; 1988, 263(11):5070-4.
- [42] Aguilera G, Hyde CL, Catt KJ. Angiotensin II receptors and prolactin release in pituitary lactotrophs. *Endocrinology.*; 1982, 111(4):1045-50.
- [43] Steele MK, Myers LS. In vivo studies on paracrine actions of pituitary angiotensin II in stimulating prolactin release in rats. *Am J Physiol.*; 1990, 258:E619-24.
- [44] Steele MK, McCann SM, Negro-Vilar A. Modulation by dopamine and estradiol of the central effects of angiotensin II on anterior pituitary hormone release. *Endocrinology.*; 1982, 111(3):722-9.
- [45] Seltzer A, Tsutsumi K, Shigematsu K, Saavedra JM. Reproductive hormones modulate angiotensin II AT1 receptors in the dorsomedial arcuate nucleus of the female rat. *Endocrinology.*; 1993,133(2):939-41.

- [46] González Iglesias A, Suárez C, Feierstein C, Díaz-Torga G, Becu-Villalobos D. Desensitization of angiotensin II: effect on $[Ca^{2+}]_i$, inositol triphosphate, and prolactin in pituitary cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001, 280(3):E462-70.
- [47] Drago F. Prolactin and sexual behavior: a review. *Neurosci Biobehav Rev.*; 1984, 8(4):433-9.
- [48] Drago F, Lissandrello CO. The "low-dose" concept and the paradoxical effects of prolactin on grooming and sexual behavior. *Eur J Pharmacol.*; 2000, 405(1-3):131-7.
- [49] Gill-Sharma MK. Prolactin and male fertility: the long and short feedback regulation. *Int J Endocrinol.*; 2009, 687259: 1-13.
- [50] Kokay IC, Petersen SL, Grattan DR. Identification of prolactin-sensitive GABA and kisspeptin neurons in regions of the rat hypothalamus involved in the control of fertility. *Endocrinology.*; 2011, 152(2):526-35.
- [51] Krüger TH, Haake P, Haverkamp J, Krämer M, Exton MS, Saller B, Leygraf N, Hartmann U, Schedlowski M. Effects of acute prolactin manipulation on sexual drive and function in males. *J Endocrinol.*; 2003, 179(3):357-65.
- [52] Hull EM, Muschamp JW, Sato S. Dopamine and serotonin: influences on male sexual behavior. *Physiol Behav.*; 2004, 83(2):291-307.
- [53] Cruz-Casallas PE, Nasello AG, Hucke EE, Felicio LF. Dual modulation of male sexual behavior in rats by central prolactin: relationship with in vivo striatal dopaminergic activity. *Psychoneuroendocrinology.*; 1999, 24(7):681-93.
- [54] Corona G, Mannucci E, Fisher AD, Lotti F, Ricca V, Balercia G, Petrone L, Forti G, Maggi M.J. Effect of hyperprolactinemia in male patients consulting for sexual dysfunction. *Sex Med.*; 2007, 4(5):1485-93.

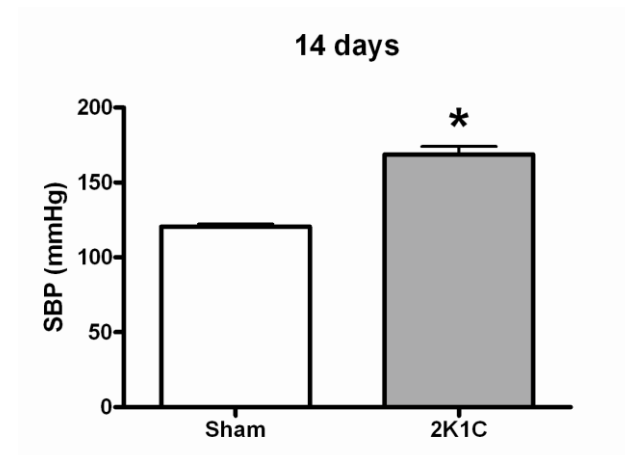
- [55] Mohankumar PS, Mohankumar SM, Quadri SK, Voogt JL. Chronic hyperprolactinemia and changes in dopamine neurons. *Brain Res Bull.*; 1997, 42(6):435-41.
- [56] Emeric-Sauval E. Corticotropin-releasing factor (CRF): a review. *Psychoneuroendocrinology.*; 1986, 11(3):277-94.
- [57] Sumitomo T, Suda T, Nakano Y, Tozawa F, Yamada M, Demura H. Angiotensin II increases the corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid level in the rat hypothalamus. *Endocrinology.*; 1991, 128(5):2248-52.
- [58] Müller H, Schweitzer N, Jöhren O, Dominiak P, Raasch W. Angiotensin II stimulates the reactivity of the pituitary-adrenal axis in leptin-resistant Zucker rats, thereby influencing the glucose utilization. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*; 2007, 293(3):E802-10.
- [59] Heaney AP, Ferguson T, Sheridan B, Atkinson AB. Cortisol excretion in essential hypertension. *J Hum Hypertens.*; 1995, 9(12):947-51.
- [60] Nyklíček I, Bosch JA, Amerongen AV. A generalized physiological hyperreactivity to acute stressors in hypertensives. *Biol Psychol.*; 2005, 70(1):44-51.
- [61] Pelisch N, Hosomi N, Ueno M, Nakano D, Hitomi H, Mogi M, Shimada K, Kobori H, Horiuchi M, Sakamoto H, Matsumoto M, Kohno M, Nishiyama A. Blockade of AT1 Receptors Protects the Blood-Brain Barrier and Improves Cognition in Dahl Salt-Sensitive Hypertensive Rats. *Am J Hypertens.*; 2011, 24(3):362-8.
- [62] Grove KL, Speth RC. Rat epididymis contains functional angiotensin II receptors. *Endocrinology.*; 1989, 125(1):223-30.

- [63] Ishida M, Yoshida M, Fukuta S, Uemura K, Iijima M, Horiguchi K, Harigaya T. Analysis of prolactin gene expression and cleaved prolactin variants in the mouse testis and spermatozoa. *J Reprod Dev.*; 2010, 56(6):567-74.
- [64] Guillaumot P, Benahmed M. Prolactin receptors are expressed and hormonally regulated in rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol.*; 1999, 149(1-2):163-8.
- [65] Bartke A, Goldman BD, Bex F, Dalterio S. Effects of prolactin (PRL) on pituitary and testicular function in mice with hereditary PRL deficiency. *Endocrinology.*; 1977, 101(6):1760-6.
- [66] Zipf WB, Payne AH, Kelch RP. Prolactin, growth hormone, and luteinizing hormone in the maintenance of testicular luteinizing hormone receptors. *Endocrinology.*; 1978, 103(2):595-600.
- [67] Itoh N, Akagashi K, Kumamoto Y, Suzuki T, Ohta Y. Influence of hypertensive vascular changes in intratesticular arteries on spermatogenesis in SHRSP. *Clin Exp Pharmacol Physiol Supp.*; 1995, 22(1):S134-5.

A)



B)



C)

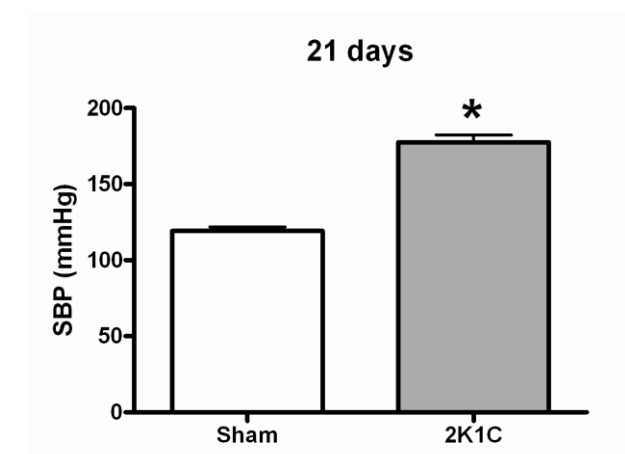
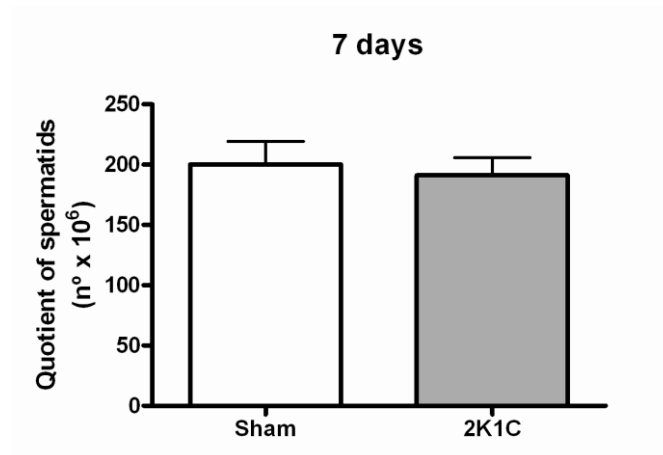
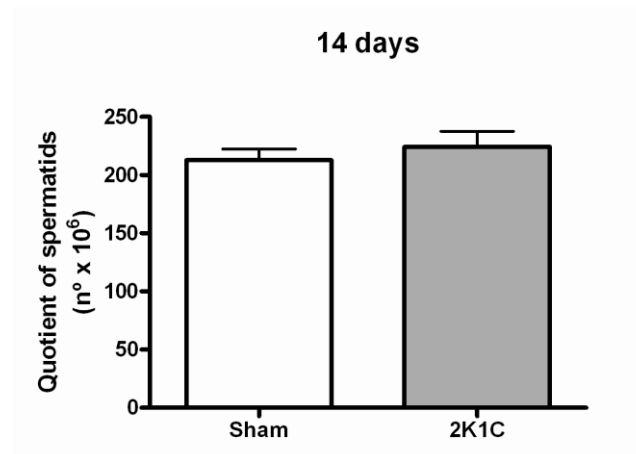


Figure 1:

A)



B)



C)

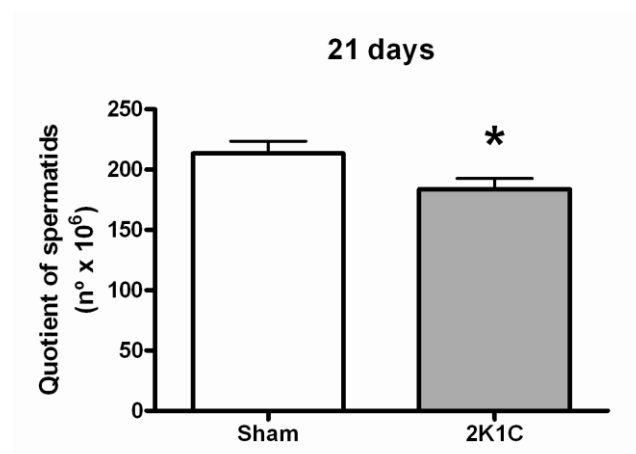
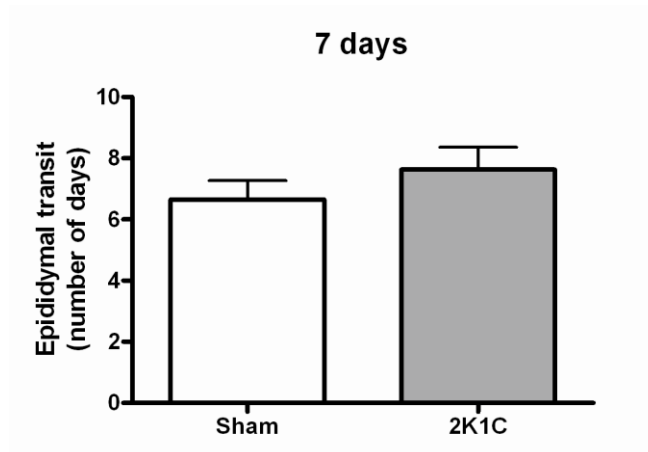
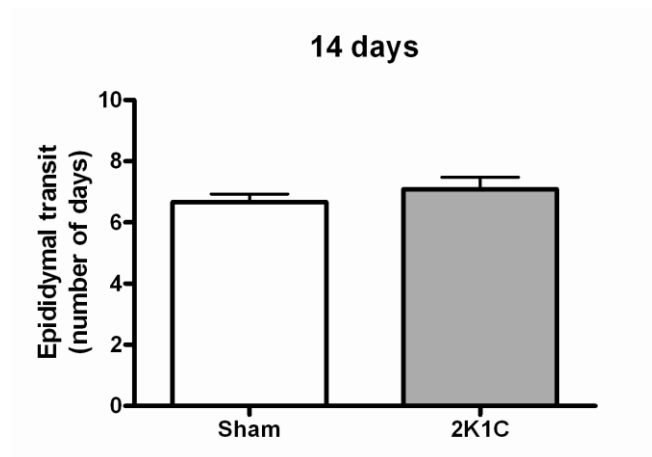


Figure 2:

A)



B)



C)

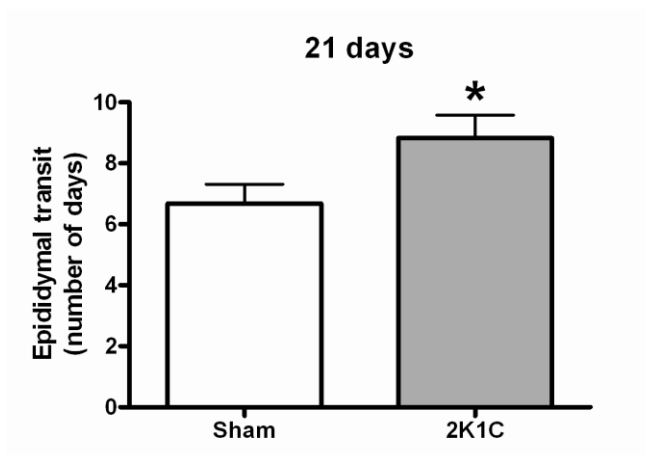


Figure 3:

Figure 1: Effects of renovascular hypertension on systolic blood pressure (SBP; mmHg) of male rats after 7 (Panel A), 14 (Panel B) or 21 days (Panel C) of sham or clipping renal artery (2K1C) surgery. Data were plotted as means \pm SEM. Student's t-test was used for comparisons between sham and 2K1C surgery from each group; (*) P<0.05.

Figure 2: Effects of renovascular hypertension on Quotient of spermatids ($n^{\circ} \times 10^6$) of male rats after 7 (Panel A), 14 (Panel B) or 21 days (Panel C) of sham or clipping renal artery (2K1C) surgery. Data were plotted as means \pm SEM. Student's t-test was used for comparisons between sham and 2K1C surgery from each group; (*) P<0.05.

Figure 3: Effects of renovascular hypertension on Epididymal transit (number of days) of male rats after 7 (Panel A), 14 (Panel B) or 21 days (Panel C) of sham or clipping renal artery (2K1C) surgery. Data were plotted as means \pm SEM. Student's t-test was used for comparisons between sham and 2K1C surgery from each group; (*) P<0.05.

Table 1

Effects of renovascular hypertension on plasma Ang II, LH, testosterone, prolactin and corticosterone concentrations of male rats after 21, 14 or 7 days of sham or 2K1C surgery.

	7 days		14 days		21 days	
	SHAM	2K1C	SHAM	2K1C	SHAM	2K1C
Plasma Ang II (ng/mL)	0.4 ± 0.1	0.9 ± 0.1*	0.5 ± 0.1	1.3 ± 0.3*	0.5 ± 0.03	2.6 ± 0.9*
Plasma LH (ng/mL)	3.5 ± 0.5	2.3 ± 0.3*	3.1 ± 0.4	4.2 ± 0.5	2.9 ± 0.3	4.3 ± 0.4*
Plasma testosterone (ng/mL)	0.49 ± 0.1	0.37 ± 0.1	0.80 ± 0.1	0.75 ± 0.1	0.68 ± 0.2	0.52 ± 0.1
Plasma prolactin (ng/mL)	3.8 ± 0.4	4.4 ± 0.3	3.5 ± 0.3	5.5 ± 0.3*	3.1 ± 0.4	4.6 ± 0.4*
Plasma corticosterone (ng/mL)	97.7 ± 15.8	84.2 ± 24.3	85.3 ± 10.6	95.5 ± 5.9	100.1 ± 15.4	86.9 ± 16.7

Data were expressed as mean ± SEM. Student's t-test was used for comparisons between sham and 2K1C surgery from each group; (*) P < 0.05.

Table 2

Effects of renovascular hypertension on sexual behavior of male rats after 21, 14 or 7 days of sham or 2K1C surgery.

	7 days		14 days		21 days	
	SHAM	2K1C	SHAM	2K1C	SHAM	2K1C
Frequency of intromissions (n°)	11.1 ± 0.7	6.1 ± 0.7*	8.3 ± 1.2	4.4 ± 0.6*	10.9 ± 1.3	4.4 ± 0.8*
Intromission Latency (s)	15.1(12.0/22.2)	15.7(11.0/30.85)	14.5(8.9/26.6)	44.5(16.5/189.5)*	11.7(6.4/13.7)	77.3(14.9/138.1)*
Ejaculation Latency (s)	621.6(569.5/755.8)	346.1(206.2/869.2)	398.9(282.7/513.3)	1138(964.1/1393.0)*	380.5(251.3/543.8)	1190(816.3/1688.0)*
Rats that presented ejaculation (%)	100(10/10)	100(10/10)	100(10/10)	90(9/10)*	100(10/10)	80(2/10)*

Comparisons between clipping renal artery (2K1C) and sham surgery for each group. Values are means ± SEM and analyzed by Student's t-test for frequency of intromissions (number) corresponding to 600 seconds recording session. Values are medians (interquartile interval) and analyzed by Mann-Whitney test for intromission latency corresponding to 600 seconds recording session and for ejaculation latency corresponding to 1800 seconds recording session. Chi-square test for comparison the percentage of animals in each group that presented ejaculation; numbers in parenthesis indicate animals that ejaculated by the total number of animals in the group; (*) P < 0.05.