

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - FISILOGIA

**EFEITOS DA HIPERTENSÃO RENOVASCULAR  
SOBRE A FUNÇÃO REPRODUTIVA DE RATOS MACHOS *Wistar***

**Tese de Doutorado**

**Márcia Koja Breigeiron**

**Porto Alegre**

**2005**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

**EFEITOS DA HIPERTENSÃO RENOVASCULAR  
SOBRE A FUNÇÃO REPRODUTIVA DE RATOS MACHOS *Wistar***

**Márcia Koja Breigeiron**

Orientador

Prof. Gilberto Luiz Sanvitto

Co-orientador

Prof. Aldo Bolten Lucion

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas: Fisiologia.

**Porto Alegre**

**2005**

**"Se as coisas são inatingíveis...ora!  
Não é motivo para não querê-las...  
Que tristes os caminhos,  
se não fora  
a presença distante das estrelas!"**

*Mário Quintana*

Esta frase reforça o quanto não podemos  
desistir daquilo que acreditamos.

Agora, estou aqui,  
cumprindo mais uma etapa, com muita alegria,  
das muitas que a vida ainda vai me proporcionar!

Ao Ricardo, “*meu lugar seguro*” ...

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

À minha mãe, por estar sempre ao meu lado...

## ***AGRADECIMENTOS***

---

Agradeço a DEUS, em primeiro lugar, por me proporcionar saúde, disposição, humildade e perseverança.

Ao professor Dr. Gilberto Luiz Sanvito, pela orientação e pelo crédito a minha pessoa como aluna, o que me fez superar muitas dificuldades.

Ao professor Dr. Aldo Bolten Lucion, pelo apoio, sabedoria e amizade. Um grande mestre!

Aos colegas de laboratório: Charlis Raineiki, em especial, por todas as idéias compartilhadas; Cármen Gomes; Ana Lúcia Ceconelo; Fernando Benneti; Elisa Winkelmann; Anelise Todeschini, Márcio Donadio; Márcia Azevedo; Isabel Fossati; Gabriela Severino; Natália Uriarte; Rosane Ribeiro; e aos ex-colegas: Rosa Almeida; Angélica Consiglio, um exemplo a ser seguido; Márcia Giovenardi; Maristela Padoin e Érica Hermel que contribuíram com amizade e coleguismo nas mais diversas situações.

Ao colega Ângelo Piato, pelo carinho, paciência e grande apoio no início dos trabalhos, onde, ainda como aluno da iniciação científica, me ajudou a “descobrir” a melhor maneira de realizar as técnicas cirúrgicas necessárias para este estudo.

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

A Dn<sup>a</sup> Geni e sua equipe, pelo cuidado dos animais de forma dedicada e objetiva.

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

À Patrícia Bock e à Tânia Fernandes, Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, pela paciência com que me ensinaram as técnicas cirúrgicas utilizadas neste trabalho.

Ao professor Dr. Celso R. Franci, Sônia A. Zanon e Ariana Mathias Fernandes, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / USP, pela assistência nas dosagens hormonais.

À grande amiga e colega Renata Mazaro e à Professora Dra. Teresa Lamano-Carvalho, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto / USP, pela paciência, apoio e auxílio em desvendar os mistérios da espermatogênese.

Ao grande mestre e professor Dr. Luiz Carlos Rios Kucharski pelo carisma e disponibilidade em ajudar a resolver alguns problemas condizentes com minha atuação como aluna.

À bibliotecária Antonieta pelo carinho e profissionalismo.

A todos os colegas dos demais laboratórios, pelo companheirismo.

Aos meus queridos ratinhos, agradeço e peço desculpas pelas ações as quais me vi obrigada a realizar.

Às colegas da FAENFI/PUC-RS e UCS, e aos meus queridos alunos, pela seriedade, compreensão, apoio e incentivo nestes quatro anos como doutoranda.

Ao meu marido, Ricardo Breigeiron, pelo amor, dedicação e por tudo o que ele representa para a minha vida!

Aos meus pais, Valter (*in memoriam*) e Leny Koja, pelo grande incentivo ao estudo durante toda a minha formação!

À minha querida sogra, Neusa Breigeiron, pela grande mulher a qual me espelho!

À Muky, que, com seu jeitinho canino, me incentiva em todos os momentos!

À CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

## ***SUMÁRIO***

---



<b>Lista de tabelas e figuras</b> .....	xii
<b>Abreviaturas</b> .....	xiv
<b>Resumo</b> .....	xvii
<b>Abstract</b> .....	xx
<b>Introdução</b> .....	1
1. Reprodução – aspectos gerais.....	2
1.1. Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal.....	3
1.1.1. Hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH), hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH).....	3
1.1.2. Testosterona.....	5
1.1.3. Prolactina.....	7
1.2. Gametogênese em machos.....	9
1.2.1. Testículo.....	9
1.2.2. Espermatogênese.....	10
2. Comportamento sexual.....	12
2.1. Rotas neurais envolvidas no comportamento sexual.....	12
2.2. Seqüência do comportamento sexual de ratos machos.....	13
3. Função reprodutiva e hipertensão.....	16
3.1. Modelo experimental da hipertensão renovascular – 2 rins/1clipe (2R/1C).....	17
3.2. Bloqueador de canais de cálcio nifedipina – aspectos gerais.....	18
4. Angiotensina II.....	19
4.1. Aspectos gerais.....	19
4.2. Angiotensina II e pressão arterial.....	21
4.3. Angiotensina II e função reprodutiva.....	22
<b>Justificativa</b> .....	26
<b>Hipótese</b> .....	28
<b>Objetivos</b> .....	30
<b>Material e métodos</b> .....	32
1. Animais.....	33
2. Iniciação da experiência sexual de ratos machos.....	33
3. Teste de desempenho sexual.....	34
4. Preparação do modelo de hipertensão renovascular (2R/1C).....	34
5. Cateterização da artéria femoral.....	35
6. Comportamento sexual.....	36
6.1. Parâmetros comportamentais analisados.....	36
6.2. Registro do comportamento sexual de ratos machos.....	39
7. Registro da pressão arterial média (PAM).....	40
8. Coleta sangüínea.....	41
9. Radioimunoensaio.....	41
10. Administração do bloqueador de canais de cálcio nifedipina.....	42
11. Aferição do peso corporal e renal.....	43
12. Avaliação da espermatogênese.....	44

12.1. Produção e maturação espermática.....	44
12.2. Quantidade de espermátides no testículo.....	44
12.3. Quantidade de espermatozói­de no epidídimo.....	44
12.4. Cálculo da produção espermática diária (PED) e trânsito epidimário (TE).....	45
13. Desenho experimental.....	47
13.1. Experimento I – Avaliação da função reprodutiva de ratos machos induzidos à hipertensão pelo modelo 2R/1C.....	47
13.1.1. Objetivo.....	47
13.1.2. Análise estatística.....	48
13.2. Experimento II – Avaliação da função reprodutiva de ratos machos submetidos à cirurgia fictícia ou ao modelo 2R/1C e tratados com o bloqueador de canais de cálcio nifedipina.....	48
13.2.1. Objetivo.....	49
13.2.2. Análise estatística.....	49
14. Resumo do protocolo experimental.....	51
<b>Resultados.....</b>	<b>52</b>
1. Expressão dos resultados.....	53
2. Experimentos.....	55
2.1. Experimento I – Avaliação da função reprodutiva de ratos machos induzidos à hipertensão pelo modelo 2R/1C.....	55
2.1.1. Pressão arterial média (PAM).....	55
2.1.2. Peso renal/peso corporal.....	56
2.1.2.1. Peso renal esquerdo/peso corporal.....	56
2.1.2.2. Peso renal direito/peso corporal.....	57
2.1.3. Comportamento sexual.....	58
2.1.4. Concentração plasmática dos hormônios.....	60
2.1.4.1. Prolactina (PRL).....	60
2.1.4.2. Hormônio luteinizante (LH).....	61
2.1.4.3. Hormônio folículo estimulante (FSH).....	62
2.1.4.4. Testosterona.....	63
2.1.5. Espermatogênese.....	64
2.1.5.1. Quociente de espermátides.....	64
2.1.5.2. Trânsito epidimário.....	65
2.2. Experimento II – Avaliação da função reprodutiva de ratos machos submetidos à cirurgia fictícia ou modelo 2R/1C e tratados com o bloqueador de canais de cálcio nifedipina.....	67
2.2.1. Pressão arterial média (PAM).....	67
2.2.2. Peso renal/peso corporal.....	69
2.2.2.1. Peso renal esquerdo/peso corporal.....	69
2.2.2.2. Peso renal direito/peso corporal.....	71
2.2.3. Comportamento sexual.....	72
2.2.4. Concentração plasmática dos hormônios.....	76
2.2.4.1. Prolactina (PRL).....	76
2.2.4.2. Hormônio luteinizante (LH).....	78
2.2.4.3. Hormônio folículo estimulante (FSH).....	80
2.2.4.4. Testosterona.....	82

2.2.5. Espermatogênese.....	84
2.2.5.1. Quociente de espermátides.....	84
2.2.5.2. Trânsito epididimário.....	86
<b>Discussão.....</b>	<b>88</b>
1. Ratos machos com hipertensão induzida pelo modelo 2R/1C apresentam alteração na relação peso renal/peso corporal.....	90
2. Ratos machos 2R/1C apresentam PAM elevada; entretanto quando tratados com o bloqueador de canais de cálcio nifedipina apresentam PAM normal.....	92
3. Ratos machos com hipertensão induzida pelo modelo 2R/1C apresentam diminuição do comportamento sexual; entretanto, ratos 2R/1C, tratados com o bloqueador de canais de cálcio nifedipina, apresentam comportamento sexual normal.....	96
4. Ratos machos com hipertensão induzida pelo modelo 2R/1C apresentam aumento da PRL plasmática; entretanto, ratos 2R/1C tratados com o bloqueador de canais de cálcio nifedipina apresentam concentração plasmática de PRL normal.....	102
5. Ratos machos com hipertensão induzida pelo modelo 2R/1C e que apresentam aumento da PRL plasmática, exibem diminuição do comportamento sexual, enquanto que 2R/1C tratados com o bloqueador de canais de cálcio nifedipina apresentam comportamento sexual e PRL plasmática normais.....	104
6. Ratos 2R/1C apresentam redução do FSH plasmático, independente do tratamento com o bloqueador de canais de cálcio nifedipina.....	107
7. Ratos 2R/1C apresentam redução da testosterona plasmática; entretanto, quando tratados com o bloqueador de canais de cálcio nifedipina, mantêm a redução da testosterona plasmática e exibem um comportamento sexual normal.....	110
8. Ratos 2R/1C apresentam redução do quociente de espermátides e aumento do trânsito epididimário; o tratamento com o bloqueador de canais de cálcio nifedipina não reverte os efeitos sobre a espermatogênese.....	114
<b>Conclusões.....</b>	<b>117</b>
<b>Considerações Finais.....</b>	<b>120</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>122</b>

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

### TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Comportamento sexual de ratos machos submetidos à cirurgia fictícia e ao modelo 2R/1C.....	59
<b>Tabela 2.</b> Comportamento sexual de ratos machos submetidos à cirurgia fictícia e ao modelo 2R/1C, tratados com veículo ou com o bloqueador de canais de cálcio nifedipina.....	75

### FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Via de síntese dos hormônios esteróides gonadais.....	6
<b>Figura 2.</b> Parâmetros comportamentais.....	38
<b>Figura 3.</b> Curva de ingestão hídrica de ratos machos 2R/1C.....	43
<b>Figura 4.</b> PAM de ratos machos após vinte e oito dias de cirurgia fictícia ou “clipamento” da artéria renal.....	55
<b>Figura 5.</b> Peso renal esquerdo/peso corporal de ratos machos após vinte e oito dias de cirurgia fictícia ou “clipamento” da artéria renal.....	56
<b>Figura 6.</b> Peso renal direito/peso corporal de ratos machos após vinte e oito dias de cirurgia fictícia ou “clipamento” da artéria renal.....	57
<b>Figura 7.</b> Concentração plasmática PRL de ratos machos após vinte e oito dias de cirurgia fictícia ou “clipamento” da artéria renal.....	61
<b>Figura 8.</b> Concentração plasmática LH de ratos machos após vinte e oito dias de cirurgia fictícia ou “clipamento” da artéria renal.....	62
<b>Figura 9.</b> Concentração plasmática FSH de ratos machos após vinte e oito dias de cirurgia fictícia ou “clipamento” da artéria renal.....	63
<b>Figura 10.</b> Concentração plasmática testosterona de ratos machos após vinte e oito dias de cirurgia fictícia ou “clipamento” da artéria renal.....	64
<b>Figura 11.</b> Quociente de espermátides de ratos machos após vinte e oito dias de cirurgia fictícia ou “clipamento” da artéria renal.....	65

<b>Figura 12:</b> Trânsito epididimário de ratos machos após vinte e oito dias de cirurgia fictícia ou “clipamento” da artéria renal.....	66
<b>Figura 13.</b> PAM de ratos machos após vinte e oito dias de cirurgia fictícia ou “clipamento” da artéria renal, tratados com nifedipina ou em uso de veículo.....	68
<b>Figura 14.</b> Peso renal esquerdo/peso corporal de ratos machos após vinte e oito dias de cirurgia fictícia ou “clipamento” da artéria renal, tratados com nifedipina ou em uso de veículo.....	70
<b>Figura 15.</b> Peso renal direito/peso corporal de ratos machos após vinte e oito dias de cirurgia fictícia ou “clipamento” da artéria renal, tratados com nifedipina ou em uso de veículo.....	72
<b>Figura 16.</b> Concentração plasmática PRL de ratos machos após vinte e oito dias de cirurgia fictícia ou “clipamento” da artéria renal, tratados com nifedipina ou em uso de veículo.....	77
<b>Figura 17.</b> Concentração plasmática LH de ratos machos após vinte e oito dias de cirurgia fictícia ou “clipamento” da artéria renal, tratados com nifedipina ou em uso de veículo.....	79
<b>Figura 18.</b> Concentração plasmática FSH de ratos machos após vinte e oito dias de cirurgia fictícia ou “clipamento” da artéria renal, tratados com nifedipina ou em uso de veículo.....	81
<b>Figura 19.</b> Concentração plasmática testosterona de ratos machos após vinte e oito dias de cirurgia fictícia ou “clipamento” da artéria renal, tratados com nifedipina ou em uso de veículo.....	83
<b>Figura 20.</b> Quociente de espermátides de ratos machos após vinte e oito dias de cirurgia fictícia ou “clipamento” da artéria renal, tratados com nifedipina ou em uso de veículo.....	85
<b>Figura 21:</b> Trânsito epididimário de ratos machos após vinte e oito dias de cirurgia fictícia ou “clipamento” da artéria renal, tratados com nifedipina ou em uso de veículo.....	87

## ***ABREVIATURAS***

---

- **2R/1C** – dois rins-um clipe
- **AMe** – núcleo medial da amígdala
- **AngII** – angiotensina II
- **APOM** – área pré-óptica medial
- **ARQ** – núcleo arqueado
- **AVP** – peptídeo arginina-vasopressina
- **BO** – bulbo olfatório
- **BSNT** – núcleo próprio da lâmina terminal
- **CE** – concentração de espermatozóides
- **CSF** – fluido cérebro-espinhal
- **DTH** – diidrotestosterona
- **FSH** – hormônio folículo estimulante
- **GABA** – ácido  $\gamma$  aminobutírico
- **icv** – intracerebroventricular
- **ip** – intraperitoneal
- **iv** – intravenosa
- **LH** – hormônio luteinizante
- **LHRH** – hormônio liberador do hormônio luteinizante
- **NO** – óxido nítrico
- **NPMmg** – subdivisão magnocelular do núcleo pré-óptico medial
- **NTS** – núcleo trato solitário
- **OCVs** – órgãos circumventriculares
- **OVLt** – órgão vascular da lâmina terminal
- **OVX** – ovariectomia
- **PAM** – pressão arterial média
- **PED** – produção espermática diária
- **PRL** – prolactina
- **PrRP** – peptídeo liberador de prolactina
- **PVN** – núcleo paraventricular
- **QE** – quociente espermático/testículo
- **sc** – subcutâneo
- **SFO** – órgão subfornicial

- **SHR** – ratos espontaneamente hipertensos
- **SNC** – sistema nervoso central
- **SNS** – sistema nervoso simpático
- **SRA** – sistema renina-angiotensina
- **TE** – trânsito epididimário
- **VMH** – núcleo ventromedial do hipotálamo



***RESUMO***

---

O presente estudo investiga a função reprodutiva de ratos machos com hipertensão induzida pelo modelo dois-rins, um-clipe (2R/1C), e de ratos 2R/1C normotensos devido ao tratamento com o bloqueador de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  nifedipina. O aumento da AngII periférica/central é característico do modelo 2R/1C. Parâmetros de comportamento sexual (latência e frequência de monta com intromissão, latência de ejaculação e duração do intervalo pós-ejaculatório) e de espermatogênese (quociente espermático e trânsito epididimário), e hormônios plasmáticos (LH, FSH, PRL e testosterona) foram utilizados para a avaliação da função reprodutiva dos animais. Noventa e nove ratos *Wistar* foram utilizados neste estudo, divididos em seis grupos: 2R/1C- ratos com hipertensão induzida pelo modelo 2R/1C; FICT- ratos com cirurgia fictícia; 2R/1C+V- ratos 2R/1C que usaram veículo; 2R/1C+N- ratos 2R/1C que foram tratados com nifedipina; FICT+V- ratos FICT que usaram veículo; FICT+N- ratos FICT que foram tratados com nifedipina. Os animais permaneceram “clipados” na artéria renal durante vinte e oito dias. O tratamento oral com nifedipina (10mg/kg/rato) foi iniciado no primeiro dia após o “clipamento” da artéria renal. O comportamento sexual foi registrado por vídeo e a pressão arterial média (PAM) foi aferida por cateter inserido na artéria femoral. Após o registro de PAM, os animais foram mortos para coleta de sangue e retirada das gônadas. Os resultados mostraram que o grupo 2R/1C exibe elevada PAM, aumento da latência de monta com intromissão e de ejaculação, aumento da duração do intervalo pós-ejaculatório, redução do número de animais que ejaculam e que apresentam período pós-ejaculatório, aumento da PRL com redução da testosterona plasmática, e redução do quociente espermático com aumento do trânsito epididimário, quando comparado ao grupo FICT. Entretanto, animais 2R/1C+N apresentaram valores de comportamento sexual e dos hormônios plasmáticos semelhantes aos animais FICT+V ou FICT+N, diferindo significativamente apenas dos ratos 2R/1C+V.

Animais 2R/1C+V e 2R/1C+N mantiveram o prejuízo da espermatogênese. Os dados sugerem uma associação entre hipertensão induzida pelo modelo 2R/1C e redução da função reprodutiva; no entanto, o comportamento sexual e a PRL plasmática, ambos normais, foram coincidentes com uma PAM normal. Os efeitos da nifedipina sobre o impedimento em diminuir o comportamento sexual e em aumentar a PRL plasmática, e sobre a manutenção do prejuízo na espermatogênese acontece somente em animais “clipados” na artéria renal. A AngII elevada, característica do modelo 2R/1C, parece ter ação decisiva sobre o prejuízo na espermatogênese, o mesmo não acontecendo quanto à redução do comportamento sexual e ao aumento da PRL plasmática.

***ABSTRACT***

---

The present study investigates the reproductive function in male rats with two-kidney, one-clip renovascular hypertension (2K/1C); and in 2K/1C male rats, but without hypertension due to the treatment with nifedipine, a Ca<sup>2+</sup> channel blocker. The increase of the central/peripheral AngII is characteristic of the 2K/1C model. Parameters of sexual behavior (latency and frequency of the mount with pelvic thrusting, ejaculation and post ejaculatory interval) and of spermatogenesis (quocienty of spermatids and epididymal transit), and plasmatic hormones (LH, FSH, PRL and testosterone) were used for the evaluation of the reproductive function of the animals. Ninety nine *Wistar* rats were used in this study and divided in six groups: 2K/1C – hypertensive rats (2K/1C model); SHAM - rats with sham surgery; 2K/1C+V- 2K/1C rats with used vehicle; 2K/1C+N - 2K/1C rats treated with nifedipine; SHAM+V- sham rats and used vehicle; SHAM+N - sham rats treated with nifedipine. The animals stayed with the clip in the renal artery for twenty-eight days. The oral treatment with the nifedipine (10mg/kg/rat) began in the first day after the clipping of the renal artery. Sexual behavior was registered by video and the mean arterial blood pressure (MABP) was measured by a catheter inserted in the femoral artery. After the registration of MABP, the animals were killed to collect the blood, and the testicles and epididyimides were removed. The 2K/1C group showed significantly higher MABP, increase of the latencies of mount with pelvic thrusting and ejaculation, increase interval post ejaculatory duration, reduction of the number of animals that ejaculate and show interval post ejaculatory, increase PRL and decrease testosterone plasma concentrations, reduction of the quocienty of spermatids and increase epididymal transit, when compared to SHAM group. However, 2K/1C rats treated with nifedipine showed similar sexual behavior parameters and plasmatic hormones when compared to SHAM+V or SHAM+N, differing significantly only for the 2K/1C+V group. 2K/1C+V and

2K/1C+N kept the reduction of the spermatogenesis. These data suggests an association between hypertension induced by the 2K/1C model and reduction of the reproductive function, while the normal sexual behavior and plasma PRL were coincident with a normal MABP. The effects of the nifedipine in impeding the reduction of the sexual behavior and the increase of the PRL, and in maintaining the reduction of the spermatogenesis happens, only, in rats with clipping the renal artery. The higher levels of AngII, characteristic of the 2K/1C model, seems to have decisive action in the spermatogenesis damage, the same does not occurring on the sexual behavior reduction and the plasma PRL increases.

## ***INTRODUÇÃO***

---





## **1. Reprodução – aspectos gerais**

Em sentido amplo, a reprodução compreende todos os acontecimentos fisiológicos (somáticos e comportamentais) que asseguram a perpetuação da espécie (Libertun, 2004).

A reprodução em mamíferos encontra-se sob o controle dos sistemas nervoso e endócrino que atuam de forma coordenada na promoção, no desenvolvimento e na maturação dos caracteres sexuais e dos comportamentos relacionados. O sistema nervoso é receptor e coordenador dos estímulos ambientais que influenciam a reprodução, sintetizando hormônios hipotalâmicos reguladores da liberação dos hormônios hipofisários, sendo que estes, por sua vez, agem sobre a função gametogênica e endócrina das gônadas. Os hormônios gonadais, além de promoverem 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 (Naftolin, 1981; Libertun, 2004).

A ação dos hormônios gonadais promove a diferenciação do sistema nervoso revelando condutas distintas entre machos e fêmeas no que se refere ao comportamento sexual e a atitudes relacionadas à reprodução (ver revisão de Pilgrim & Reisert, 1992).

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

No macho, a ação do hipotálamo sobre a hipófise na secreção das gonadotrofinas, juntamente com os androgênios, regula a atividade proprioceptiva e consumatória do comportamento sexual, como também, permite um ambiente testicular adequado para o desenvolvimento dos gametas masculino. Portanto, as interações entre os fatores neurais, endócrinos, bioquímicos e anatômicos, centrais ou periféricos, fazem a diferença na efetividade da função reprodutiva, onde um fator passa a não ser menos importante do que o outro. Neste contexto, para o sucesso de uma seqüência reprodutiva, devem ser considerados os aspectos moduladores do comportamento sexual, onde rotas neurais íntegras são reguladas por componentes endócrinos. A função reprodutiva do macho também engloba o processo espermatogênico, em que estruturas anatômicas e componentes bioquímicos podem ser ativados ou inibidos de forma permanente ou não pelo sistema endócrino testicular, extra-testicular ou por substâncias exógenas (Libertun, 2004).

A função reprodutiva fica prejudicada quando alterações no sistema hipotálamo-hipofisário, ou na própria gônada, comprometem tanto a parte comportamental quanto a gametogênica. Vários fatores podem promover alterações na função reprodutiva; dentre estes encontramos a hipertensão (ver revisão de Clark, 1995).

## **1.1. Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal**

### **1.1.1. Hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH), hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH)**

Em ratos, o processo reprodutivo na área pré-óptica medial (APOM) ocorre com os neurônios secretores de LHRH projetando-se para a eminência mediana e liberando o LHRH para dentro dos capilares do sistema porta hipofisial até a adenohipófise (Hiney *et*

*al.*, 2002). Na adenohipófise, o LHRH estimula os gonadotrofos a secretarem as gonadotrofinas: o LH e o FSH (Libertun, 2004). Nos machos, o LH e o FSH são secretados de forma estável (Harris & Levine, 2003) diferente das fêmeas onde há picos hormonais que são subjacentes às atividades cíclicas do ovário (Freeman, 1994).

O LHRH é o mais importante regulador da função gonadotrófica (Stojilkovic & Catt, 1995; Cheng & Leung, 2000; Kakar, Malik & Winters, 2002) e sua secreção pode ser modulada por vários fatores como: noradrenalina (Saitoh, Silverman & Gibson, 1991; Helena, Franci & Anselmo-Franci, 2002; Martins-Afféri *et al.*, 2003), angiotensina II [Ang II] (Franci, Anselmo-Franci & McCann, 1990; Steele, 1992; Steele *et al.*, 1992; Dornelles & Franci, 1998*ab*), óxido nítrico (NO) (Moretto, López & Negro-Vilar, 1993; Rettori *et al.*, 1993; Reynoso *et al.*, 2002), ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) (Mitsushima, Shwe & Kimura, 2003), neuropeptídeo Y (McDonald & Calka, 1994; Li, Chen & Smith, 1999), dentre outros (Mas, 1995; Levine, 1997).

Além da ação do LHRH sobre os gonadotrofos, evidências da literatura indicam que os gonadotrofos também podem ser regulados por fatores produzidos por eles mesmos ou por células hipofisiárias adjacentes que geram efeitos próprios ou influenciam a ação do LHRH (ver revisão de Winters & Moore, 2004).

Do ponto de vista experimental, fatores que regulam a secreção do LH são diferentes daqueles que regulam a secreção do FSH (McCann *et al.*, 1983; Lumpkin *et al.*, 1989). Em ratos machos, a retirada dos estímulos do LHRH sobre a hipófise, abole a síntese e a secreção do LH, mas mantém a produção do FSH contínua (Culler & Negro-Villar, 1986; DePaolo *et al.*, 1991). Proteínas gonádicas como a ativina, inibina e folistatina atuam como importantes moduladores da secreção do FSH, sendo que a ativina

estimula, e inibina e folistatina inibem a secreção deste hormônio (DePaolo *et al.*, 1991; ver revisão de Winters & Moore, 2004).

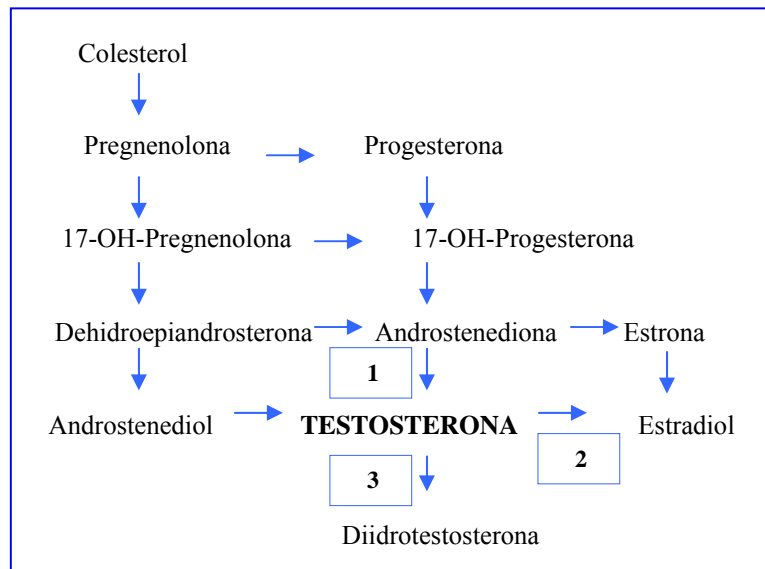
Concentrações estáveis do LH e do FSH são encontradas em ratos machos. Entretanto, a idade destes animais influencia a secreção dos hormônios gonadotróficos durante o desenvolvimento sexual: um pequeno aumento para o LH ocorre entre 22 e 83 dias de idade, e para o FSH entre 22 e 40 dias de idade, tendo o último uma sensível queda para um menor platô entre 76 e 97 dias de idade (Zanato *et al.*, 1994). O aumento das concentrações plasmáticas do FSH induz à formação de receptores do LH, propiciando que os testículos progressivamente tornem-se mais responsivos para o LH na produção de esteróides pelas células de Leydig, aumentando, assim, as concentrações plasmáticas da testosterona (Odell, 1990).

### **1.1.2. Testosterona**

A testosterona é um esteróide produzido predominantemente pelas gônadas, sendo que uma pequena parte é sintetizada pelas adrenais. A testosterona atravessa facilmente a membrana plasmática das células-alvo, e, intracelularmente, liga-se aos seus receptores citoplasmáticos para, então, o complexo ligando-receptor ser translocado para o núcleo da célula agindo sobre a transcrição e transdução protéica. Publicações recentes mostram a existência de uma rota não-transcricional da testosterona na membrana plasmática ou junto a esta (ver revisão de Littleton-Kearney & Hurn, 2004).

A síntese e a secreção da testosterona pelas células de Leydig estão sob o controle do LH, alcançando e estimulando os órgãos efetores androgênicos por via sangüínea. Nos órgãos efetores, a testosterona é transformada em diidrotestosterona (DHT) pela enzima  $5\alpha$ -redutase, ou é, em maior parte, convertida em estradiol por ação da aromatase (ver

revisão de Littleton-Kearney & Hurn, 2004). O esquema a seguir demonstra as rotas de biossíntese da testosterona:



**Figura 1:** Via de síntese dos hormônios esteróides gonadais. A testosterona é o principal produto secretado pelo testículo. As enzimas são: (1) 17 $\beta$ -OH-esteróide desidrogenase; (2) aromatase; e (3) 5 $\alpha$ -redutase. Modificado de Bergadá (2004).

Além da importante ação periférica no desencadeamento e desenvolvimento dos caracteres sexuais masculino, a testosterona tem uma ação fundamental na diferenciação sexual do encéfalo, onde fatores morfológicos e comportamentais específicos do macho e da fêmea são determinados pela presença ou ausência da testosterona durante períodos críticos do desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) (Bergadá, 2004; Bialek *et al.*, 2004; Babichev, Shishkina & Peryshkova, 1990).

Os efeitos centrais da testosterona sobre o comportamento reprodutivo são mediados, em parte, pelos receptores androgênicos (McGinnis & Dreifuss, 1989), os quais têm sido localizados em áreas particulares do encéfalo. Duas localizações neurais críticas para a regulação do comportamento sexual que contêm altas concentrações de receptores androgênicos e estrogênicos são a APOM e o núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH) (MacLusky, Lieberburg & McEwen, 1979; Simerly *et al.*, 1990; Harding & McGinnis, 2003; ver revisão de Littleton-Kearney & Hurn, 2004).

Em ratos machos, as concentrações plasmáticas de testosterona são máximas durante a puberdade (entre 50 a 70 dias de idade) e diminuem entre 80 a 90 dias de idade (Zanato *et al.*, 1994). Meisel e Sachs (1994) sugeriram que, embora o desenvolvimento do comportamento sexual seja andrógeno-dependente, a elevação da testosterona plasmática, característica da puberdade, não deve contribuir para o início do comportamento de cópula em ratos, embora o tratamento crônico com testosterona antecipa a idade da primeira monta, intromissão e ejaculação, provavelmente por estimular a motivação para a cópula em ratos pré-púberes intactos.

### **1.1.3. Prolactina (PRL)**

O hipotálamo exerce uma ação inibitória tônica sobre a secreção de PRL na adenohipófise, através da liberação de dopamina, o mais potente inibidor fisiológico de PRL tanto *in vivo* (Gibbs & Neill, 1978) quanto *in vitro* (Shaar & Clemens, 1974). A dopamina é liberada por neurônios tuberoinfundibulares hipotalâmicos nos vasos portais hipofisários e age de forma direta sobre os lactotrofos da adenohipófise, inibindo a secreção de PRL (MacLeod & Lehmeyer, 1974; ver revisão de Ben-Jonathan, 1985; ver revisão de Freeman *et al.*, 2000). Entretanto, substâncias como Ang II periférica (ver

revisão de Saavedra, 1992), peptídeo liberador de PRL (PrRP) (Hizume *et al.*, 2000), serotonina (Yebes, Li & Pelletier, 1994; Pinilla *et al.*, 2001), entre outros, exercem efeito estimulatório sobre a secreção de PRL.

Além da síntese de PRL pelos lactotrofos, PRL imunoreativa é encontrada em áreas hipotalâmicas de uma variedade de mamíferos, sendo sintetizada localmente, independente de sua síntese pela glândula hipofisiária. Entretanto, a PRL periférica pode agir diretamente sobre o SNC via fluido cérebro-espinhal (CSF) por um sistema de transporte específico mediado por receptor de PRL no plexo coróide. Assim, a PRL pode ter acesso direto da hipófise para o CSF via um fluxo retrógrado através do sistema porta hipotálamo-hipofisial (Cooke, 1989; ver revisão de Freeman *et al.*, 2000).

Durante a maturação sexual de ratos machos, um pico de PRL acontece em torno de 76 dias de idade, sendo que, após, as concentrações plasmáticas do hormônio diminuem gradativamente até alcançarem um platô mínimo entre 83 e 97 dias de idade (Zanato *et al.*, 1994).

A PRL tem ampla ação sobre a reprodução, servindo como um estimulador da função genital em machos e em fêmeas (Bole-Feysot *et al.*, 1998; Goffin *et al.*, 1998; Reichlin, 1998). O aumento da PRL plasmática durante a maturação sexual de ratos machos promove o aumento de receptores de LH nos testículos, como, também, participa do controle e desenvolvimento anatômico e funcional das glândulas sexuais acessórias (Bartke, 1980).

Quanto ao comportamento sexual masculino, a PRL pode apresentar efeito facilitador ou inibidor de acordo com o tratamento: a administração aguda de PRL, via intracerebroventricular (icv), facilita o comportamento sexual de ratos machos, onde estes mostram reduzida latência para a primeira monta sem e com intromissão, para ejaculação

e para a primeira monta pós-ejaculação, enquanto que injeções icv crônicas de PRL aumentam a latência da primeira monta sem e com intromissão e reduzem a frequência de intromissão de ratos machos (Cruz-Casallas *et al.*, 1999). A PRL em concentrações elevadas causa hipogonadismo, inibição da espermatogênese (Hermanns & Hafez, 1981; Rocco *et al.*, 1983) e impotência sexual (ver revisão de Clark, 1995; Acar *et al.*, 2004).

## **1.2. Gametogênese em machos**

### **1.2.1. Testículo**

O testículo é constituído por três estruturas principais: os túbulos seminíferos, o tecido intersticial e o estroma testicular (Bergadá, 2004).

Os túbulos seminíferos constituem a maior parte do volume testicular. Estes apresentam um aspecto tortuoso, porém na zona hilar transformam-se em tubos retos, que desembocam na rede *testis*, de onde emergem os ductos eferentes até o epidídimo, que se continua com o ducto deferente. Os túbulos seminíferos contêm no seu interior dois tipos de células: as células germinativas e as de Sertoli. As células germinativas constituem o epitélio germinativo, onde ocorre a espermatogênese. As células de Sertoli formam a barreira hematotesticular que separa dois compartimentos distintos: o espermatogênico intracelular e o espaço extracelular, protegendo o desenvolvimento do epitélio germinativo da ação de possíveis toxinas, fatores mutagênicos ou anticorpos específicos contra as células germinativas. As células de Sertoli também cumprem uma função nutridora do epitélio germinativo, sendo, portanto, denominadas de células de sustentação (Bergadá, 2004). A população de células de Sertoli aumenta no testículo do rato durante a pré-adolescência, mantendo-se estável entre 40 a 97 dias de idade (Zanato *et al.*, 1994).



No espaço intersticial observa-se a formação de células de Leydig com presença de lipídeos, além do colesterol e de enzimas especificamente vinculadas com a síntese de esteróides (Zenick *et al.*, 1994; Klinefelter & Hess, 1998).

O estroma testicular é composto pela albugínea (função de sustentação testicular), parede dos túbulos seminíferos (relacionado à contenção da estrutura intratubular, regulação da transferência de substâncias ao interior do túbulo e mobilização dos espermatozoides expulsos das células de Sertoli) e espaço intertubular (ocupado por rede frouxa de fibras de reticulina, separadas por áreas em que se acumulam proteínas séricas extravasadas dos capilares vizinhos) (Zenick *et al.*, 1994; Klinefelter & Hess, 1998).

Na puberdade observa-se um aumento total do volume testicular por estímulo gonadotrófico, em que ocorrem as seguintes mudanças morfológicas: a) aumento do tamanho e alongamento dos túbulos seminíferos; b) aumento da população celular intratubular; c) crescimento do estroma testicular; e d) aumento do conteúdo celular total do interstício (Zenick *et al.*, 1994; Klinefelter & Hess, 1998; Bergadá, 2004).

### **1.2.2. Espermatogênese**

A espermatogênese é o processo pelo qual as espermatogônias originam as espermátides maduras, e acontece em três fases distintas. Na primeira fase, as espermatogônias proliferam por mitoses sucessivas originando os espermatócitos primários (espermatócitos I) e simultaneamente renovando a própria população de espermatogônias. Na segunda fase, os espermatócitos I sofrem divisão reducional (meiose) dando origem, ao final da primeira divisão, aos espermatócitos secundários (espermatócitos II) e, ao completar a segunda divisão, às espermátides, sendo estas últimas células haplóides. A terceira fase da espermatogênese é denominada de espermiogênese, que consiste em transformações estruturais complexas das espermátides recém-formadas, culminando com

as espermátides maduras, prontas para serem liberadas para a luz dos túbulos seminíferos. A espermiogênese do rato consiste de 19 estágios de transformações sucessivas das espermátides até espermatozóides (Zenick *et al.*, 1994; Klinefelter & Hess, 1998).

As espermátides maduras, liberadas para a luz dos túbulos seminíferos, são deslocadas para a cabeça do epidídimo, onde, durante o trânsito ao longo do ducto epidimário, ocorre a maturação dos gametas (espermatozóides). Nos ratos, cerca de nove dias após a espermiação, os espermatozóides maduros atingem a porção distal da cauda do epidídimo, onde permanecem armazenados até o momento da emissão (Robb, Amman & Killian, 1978; Zenick *et al.*, 1994; Klinefelter & Hess, 1998).

Em ratos, a produção máxima de espermatozóides acontece entre 83 a 97 dias de idade (Zanato *et al.*, 1994). Entretanto, o controle hormonal da espermatogênese é complexo e variável nas diferentes fases do desenvolvimento sexual, onde o estímulo necessário para desencadeá-la é diferente daquele requerido para sua manutenção. A regulação hormonal da espermatogênese é manifestada principalmente por ação do FSH e da testosterona sobre as células de Sertoli, com subsequente modulação por fatores parácrinos. Embora o FSH seja considerado crítico para o início da espermatogênese, o processo completo requer a presença do FSH e testosterona, os quais têm efeitos sinérgicos. Entretanto, em ratos, a resposta do FSH para a manutenção da espermatogênese pode ser reproduzida pela administração exógena de testosterona ou de DHT (ver revisão de Gorczynska-Fjälling, 2004).

## **2. Comportamento sexual**

A cópula é a principal expressão comportamental da fisiologia reprodutiva; neste contexto, o comportamento sexual do macho requer um funcionamento normal do eixo hipotálamo-hipófise-testicular (Sachs & Barfield, 1970; Agmo, 1997).

No rato macho, os comportamentos que antecedem a cópula incluem perseguir a fêmea e cheirar sua área genital, e são seguidos de monta com ou sem intromissão peniana, ejaculação e intervalo pós-ejaculatório (Agmo, 1997) — a descrição dos comportamentos será abordada na sequência desta introdução.

### **2.1. Rotas neurais envolvidas no comportamento sexual**

A organização neural do comportamento sexual é formada por uma complexa rede no sistema nervoso sensível a estímulos visuais, olfatórios e quimiossensoriais que despolarizam circuitos corticais que interagem com unidades de entrada e saída no sistema límbico para que possa ser expressa uma resposta comportamental (Kelly & Jessel, 1997). O bulbo olfatório (BO) representa uma unidade de entrada que recebe informações dos quimiossensores da mucosa olfatória ou do órgão vomeronasal (Keverne, 2004). A APOM representa uma forma de unidade de saída, sendo esta o "centro" organizacional mais elevado para a expressão do comportamento sexual de machos, incluindo o rato (Wood & Newman, 1995; Wood, 1997) e crítica na ordenação dos aspectos motores da cópula (Sachs & Meissel, 1988). O núcleo medial da amígdala (AMe) é uma unidade intermediária que transmite entradas dos quimiossensores do BO para a APOM, e mostra-se fundamental no comportamento de investigação sexual (Wood & Newman, 1995; Wood, 1997) e de cópula (Dominguez *et al.*, 2001). Cada unidade é um componente importante para a atividade sexual, sendo que a destruição tanto do BO, quanto da AMe,

da APOM ou das fibras que interconectam essas estruturas, pode abolir o comportamento sexual de modo imediato e permanente. Isto implica que a representação do comportamento sexual não está relacionada somente com uma região do encéfalo, mas a uma rota neuronal que integra várias estruturas (Wood & Newman, 1995; Wood, 1997).

Outras regiões encefálicas, além do BO, da AMe e da APOM, participam da integridade das transmissões quimiossensoriais e transduções de estímulos hormonais para a efetivação do comportamento sexual. Para o comportamento de investigação, a AMe recebe conexão direta do núcleo próprio da estria terminal (BNST), que também se interconecta com a APOM, sendo o BNST intermediário das conexões entre o BO e a AMe (Li *et al.*, 1993). Outras estruturas que participam do comportamento sexual são: a subdivisão magnocelular do núcleo pré-óptico medial (NPMmag), no aspecto motor do comportamento sexual (Wood & Newman, 1995; Wood, 1997); núcleo paraventricular (PVN) na facilitação das ereções durante a cópula (ver revisão de Giuliano & Rampin, 2004); e VMH, na regulação da motivação sexual de ratos machos (Harding & McGinnis, 2003).

## **2.2. Seqüência do comportamento sexual de ratos machos**

O comportamento sexual é uma conseqüência da plasticidade do desenvolvimento do encéfalo e representa a expressão da função reprodutiva de um organismo (Harlan *et al.*, 1980). No estudo dos mamíferos, o comportamento sexual de roedores tem sido o mais investigado (Sachs & Meisel, 1988).

Considerando que estes animais apresentam hábitos noturnos, sua seqüência comportamental inicia, preferencialmente, durante o período escuro do dia (Davidson, 1966; Harlan *et al.*, 1980). O contato, num mesmo ambiente, de uma fêmea e um macho,

pode dar início a um comportamento pré-copulatório (Davidson, 1966) que dura alguns segundos. A investigação social do casal é baseada em fatores sensoriais, como informações olfatórias (Meisel, Lumia & Sachs, 1980) e vocalizações ultrasônicas (Bean, Nunez & Conner, 1981; Johnston, 1985), e inicia com o macho explorando a região anogenital da fêmea. O macho também pode lambe a fêmea, executar leves mordidas em sua cabeça e tronco (Davidson, 1966), mover-se sobre ela ou, também, "marcá-la", urinando sobre seu dorso. Uma fêmea receptiva, em estro comportamental, pode responder ao comportamento do macho com breves corridas em direção oposta a ele, saltos e paradas rápidas, sempre se posicionando com os quadrantes posteriores voltados para o macho na tentativa de promover uma maior investigação dele em relação a ela. O macho, então, a persegue, lambe e cheira sua genitália, e tenta montá-la (Sachs & Meisel, 1988).

A ocorrência do comportamento sexual envolve três atividades básicas: monta sem intromissão, monta com intromissão e ejaculação (Agmo, 1997). O macho coloca-se por detrás da fêmea e a segura pelos flancos (região retrolombar) com seus membros anteriores. Tal atividade do macho é denominada de monta sem intromissão ou monta. A fêmea, por sua vez, responde em maior ou menor grau, exacerbando a lordose lombar, permitindo a penetração vaginal (Beach, 1967; Sachs & Meisel, 1988). Na seqüência, o macho realiza movimentos pélvicos por poucos segundos pressupondo-se a penetração peniana na vagina. Este comportamento é chamado de monta com intromissão ou intromissão (Davidson, 1966). Após, ele desfaz a monta e, geralmente, realiza a auto-limpeza de seus genitais (Sachs & Barfield, 1970) ou do restante do corpo e continua a explorar o ambiente antes da próxima monta com ou sem intromissão. Logo após a monta com intromissão, ocorre uma redução temporária da excitação sexual antes que outro ato copulatório ocorra (Sachs & Barfield, 1970). Tipicamente o macho faz a intromissão

vaginal em 50 a 80 % de suas montas (Bitran & Hull, 1987). A ejaculação ocorre após várias montas, com ou sem intromissão, que sob o ponto de vista comportamental, caracteriza-se por uma intromissão peniana mais profunda e demorada que é acompanhada por abdução das patas dianteiras do macho por alguns segundos onde ele poderá permanecer imóvel sobre a fêmea. Usualmente seis a doze montas com intromissão precedem uma ejaculação. Após a ejaculação, segue-se um período onde o rato não tem atividade copulatória por cerca de quatro a oito minutos, denominado intervalo pós-ejaculatório ou período refratário (Davidson, 1966; Harlan *et al.*, 1980; Bitran & Hull, 1987; Sachs & Meisel, 1988; Lucion *et al.*, 1993). Neste intervalo o macho não é influenciado por nenhum estímulo sexual e o momento é caracterizado por sonolência e vocalizações ultrassônicas (Bean, Nunez & Conner, 1981; Johnston, 1985; Agmo, 1997).

A iniciação e a consumação do comportamento sexual dos machos são controladas por dois processos de motivação independentes: o primeiro chamado de "mecanismo de despertar sexual", em que o macho procura a fêmea para executar a monta, e o segundo, "mecanismo de intromissão e ejaculação", no qual ocorre a intromissão peniana que culmina em ejaculação (ver revisão de Mendelson & Pfaus, 1989). Para a ocorrência desses dois processos de motivação do macho, o comportamento da fêmea é de grande importância (Taylor, Weiss & Rupich, 1987; Matuszczyk & Larsson, 1993). É necessário que a fêmea esteja sexualmente receptiva para aceitar o macho na sua atividade reprodutiva. Para tal situação, torna-se indiferente usar fêmeas em estro natural ou ratas ovariectomizadas (OVXs) induzidas ao estro comportamental por injeção seqüencial de estrógeno e progesterona (Landau & Madden, 1983; Mas *et al.*, 1987; Mendelson & Pfaus, 1989). A mera presença de uma fêmea sexualmente receptiva induz a modificações comportamentais, fisiológicas e endócrinas no macho (Taylor, Weiss & Rupich, 1987),

desencadeando o processo de motivação sexual até atingir o ato copulatório propriamente dito (Mendelson & Pfaus, 1989).

### **3. Função reprodutiva e hipertensão**

Alterações genéticas e ambientais podem interromper etapas do processo reprodutivo, interferindo no comportamento sexual e na cascata metabólica da função reprodutiva. Neste contexto, a hipertensão pode alterar tanto os fatores endócrinos, como os neurais e vasculares responsáveis pela fisiologia da reprodução (Andreoli *et al.*, 1991; Carretero & Oparil, 2000).

Estudos epidemiológicos sugerem uma associação entre a doença hipertensiva e a patogênese da impotência sexual, onde o sexo masculino apresenta prejuízo da função erétil e da ejaculação (Feldman *et al.*, 1994; Greenstein *et al.*, 1997; Jensen *et al.*, 1999; Burchardt *et al.*, 2000); entretanto, o entendimento da relação entre hipertensão e disfunção sexual permanece controverso (ver revisão de Clark, 1995; Jensen *et al.*, 1999).

A hipertensão é uma elevação sustentada da pressão arterial sistêmica e pode ser produzida por aumento do débito cardíaco ou principalmente pelo aumento da resistência periférica. Na doença crônica, o mecanismo reflexo baroreceptor é reajustado para manter a pressão arterial elevada. A hipertensão é uma enfermidade muito comum nos seres humanos, sendo o principal fator de risco para doenças cardiovasculares, além de outras alterações (Carretero & Oparil, 2000).

Devido aos vários problemas decorrentes da hipertensão, e do crescente número de casos da doença, foram desenvolvidos modelos experimentais em animais para o seu estudo.

Em sua maior parte, os modelos experimentais envolvem a intervenção do funcionamento renal, do sistema nervoso ou das supra-renais, além da inibição de substâncias que participam da cascata metabólica e que integram o processo vasoativo da doença hipertensiva (Ruzicka & Leenen, 1994; Pinto, Paul & Ganten, 1998).

### **3.1. Modelo experimental de hipertensão renovascular — 2 rins/1 clipe (2R/1C)**

O modelo de hipertensão renovascular descrito por Goldblatt e colaboradores (1934) envolve a restrição do suprimento de sangue para o rim esquerdo, por “clipamento” da artéria renal esquerda, preservando-se o rim contralateral (modelo tipo I, 2R/1C). A artéria renal esquerda é a escolhida para a colocação de um clipe de prata devido às dificuldades de acesso à artéria renal direita em ratos (Ruzicka & Leenen, 1994; Pinto, Paul & Ganten, 1998).

A constrição de uma das artérias renais resulta em progressiva elevação da pressão arterial, cujos níveis pressóricos dependem do grau de constrição imposto pelo clipe e da extensão desta constrição. A aplicação do clipe na artéria renal esquerda produz pequena elevação da pressão arterial já no primeiro dia após a estenose, sendo que o alcance do platô acontece cerca de uma semana após o procedimento cirúrgico (Ruzicka & Leenen, 1994).

A elevação da pressão arterial independe do grau de estenose imposto pelo clipe, porém os valores máximos de pressão variam conforme este grau, podendo causar hipertensão de moderada à severa (Ruzicka & Leenen, 1994).

O modelo 2R/1C de hipertensão está associado com aumento da atividade da renina plasmática e hipersecreção de aldosterona (Nishimura *et al.*, 1992; Ruzicka & Leenen, 1994). Desta forma, no modelo 2R/1C, o estabelecimento e a manutenção da



hipertensão dependem principalmente do sistema renina-angiotensina (SRA), existindo componentes pressóricos rápidos (agudos) e lentos (crônicos) para o desenvolvimento da hipertensão: o componente rápido é o aumento da resistência periférica total mediada por Ang II circulante; o componente lento é o aumento no volume sanguíneo mediado por ações renais da Ang II e aldosterona, efeitos tróficos da Ang II na musculatura cardíaca e lisa (vascular), resultando em hipertrofia cardiovascular, e efeitos da Ang II na atividade simpática, além de ativação do SRA vascular (DeForrest *et al.*, 1982; Nishimura *et al.*, 1992; Ruzicka & Leenen, 1994; Kagiya *et al.*, 2001).

O rim contralateral tem um papel importante no desenvolvimento da hipertensão, pois apresenta um aumento de atividade da enzima conversora de angiotensina intra-renal e contém altas concentrações de Ang II, apesar de apresentar baixas concentrações de renina (Ruzicka & Leenen, 1994).

### **3.2. Bloqueador de canais de cálcio nifedipina – aspectos gerais**

A nifedipina é bastante utilizada no tratamento da angina de origem cardíaca e da hipertensão devido a sua ação bloqueadora dos canais de cálcio tipo L ou produtora de NO a partir do endotélio vascular. Com isso, o tratamento com nifedipina resulta em relaxamento ou prevenção da contração da musculatura cardíaca ou da musculatura lisa dos vasos, com diminuição do tônus vascular (Loutzenhiser & Epstein, 1985; Ram & Featherston, 1988; Verhaar *et al.*, 1999; Hirasawa & Pittman, 2003). No SNC, a nifedipina facilita as sinapses, independente da sua ação sobre os canais de cálcio tipo L ou da produção de NO (Hirasawa & Pittman, 2003).

Na hipertensão renovascular, a ação antihipertensiva da nifedipina está associada com a diminuição da resistência vascular renal e da resistência do fluxo sanguíneo renal,

aumento da filtração glomerular e supressão da reabsorção de água, observados, principalmente, no rim não “clipado” (Yoshida *et al.*, 1990).

## **4. Angiotensina II**

### **4.1. Aspectos gerais**

A Ang II é o produto final da cascata metabólica que se inicia a partir da ativação da enzima renina (Fitzsimons, 1980; Bottari *et al.*, 1993; Morgan, Pipkin & Kalsheker, 1996). Vários trabalhos focalizam as ações da Ang II sobre a regulação da pressão arterial, balanço hídrico e controle da função reprodutiva (Steele, Negro-Vilar & McCann, 1981; Steele, McCann & Negro-Vilar, 1982; Steele & Ganong, 1986; Khanum & Dufau, 1988; Saavedra, 1992; Ganong, 1995; Steger & Bartke, 1995; Sanvitto *et al.*, 1997; Morris *et al.*, 1999; Robinson *et al.*, 1999; Speth, Daubert & Grove, 1999).

Nas últimas décadas foram identificados sistemas renina-angiotensina locais presentes em diversos tecidos como: parede arterial, pulmão, rins, adrenal, hipófise e gônadas (Saavedra, 1992). No entanto, uma das descobertas mais importantes foi a descrição de um SRA central (Reid, 1977; McGregor *et al.*, 1995; Morgan, Pipkin & Kalsheker, 1996; Jöhren *et al.*, 1997; Sanvitto *et al.*, 1997; Laflamme *et al.*, 1998), atuando, inicialmente sobre o aumento da pressão sangüínea (Bickerton & Buckley, 1961).

Estudos prévios que demonstraram a existência de RNAm para os componentes do SRA central, sugerem a produção endógena da Ang II associada aos corpos neuronais (Lenkei *et al.*, 1997) no sistema límbico, hipotálamo, cerebelo, bulbo, medula espinhal e em muitas outras regiões do SNC (Benarroch & Schmeichel, 1998; Zhuo *et al.*, 1998). A ação da Ang II sobre o SNC ocorre através da Ang II sintetizada centralmente e da passagem da Ang II periférica pelo endotélio fenestrado dos capilares sangüíneos que

circulam os órgãos circumventriculares (OCVs), ativando os receptores de Ang II localizados em estruturas como órgão subfornicial (SFO) e órgão vascular da lâmina terminal (OVLT) (Bottari *et al.*, 1993; Lenkei *et al.*, 1997).

A Ang II exerce suas ações através de uma série de eventos de sinalização intracelular que inicia pela ligação do peptídeo aos seus receptores (McGregor *et al.*, 1995; Timmermans *et al.*, 1995; Goodfriend, Elliott & Catt, 1996; Unger *et al.*, 1996).

Os receptores de Ang II foram classificados, farmacologicamente, em dois subtipos: AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> (Saavedra *et al.*, 1993; Timmermans *et al.*, 1995; ver revisão de Gasparo *et al.*, 2000). Embora os receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> tenham sido identificados em encéfalos de ratos, o receptor AT<sub>1</sub> é o predominante em ratos adultos (Tsutsumi & Saavedra, 1991) e encontra-se localizado no plexo coróide, nas estruturas que correspondem aos OCVs e nas envolvidas na regulação cardiovascular e homeostase dos líquidos, na formação hipocampal, em áreas do sistema límbico relacionadas com o controle da função hipofisiária, e na hipófise (Jöhren & Saavedra, 1996). Entretanto, o receptor AT<sub>2</sub> é mais encontrado no SNC de humanos, predominando em tecidos fetais (McGregor *et al.*, 1995; Timmermans *et al.*, 1995), mostrando-se concentrado em áreas relacionadas ao controle e ao aprendizado da atividade motora, visual, sensorial e estruturas límbicas (Tsutsumi & Saavedra, 1991; Song *et al.*, 1992; Timmermans *et al.*, 1995; Halbach & Albrecht, 1998).

O receptor AT<sub>1</sub> é subdividido em duas isoformas distintas, AT<sub>1A</sub> e AT<sub>1B</sub>, sendo o AT<sub>1A</sub> predominante em áreas centrais envolvidas no controle da função hipofisiária, enquanto o AT<sub>1B</sub> é expresso na adenohipófise (Lenkei, Corvol & Llorens-Cortes, 1995; Jöhren & Saavedra, 1996; Matsusaka & Ichikawa, 1997).

## 4.2. Angiotensina II e pressão arterial

A Ang II é reconhecida como um fator importante na patogênese da hipertensão clínica e experimental (Fitzsimons, 1980; DeForrest *et al.*, 1982; Nishimura *et al.*, 1992; Robinson *et al.*, 1999; Kagiya *et al.*, 2001). Periféricamente, a Ang II modula a pressão arterial através de uma potente ação vasoconstritora e por ativação dos receptores pré-sinápticos excitatórios nas terminações nervosas simpáticas pós-ganglionares (Fitzsimons, 1998; Fernandez *et al.*, 2003). Centralmente, a Ang II pode regular a pressão arterial através da liberação do peptídeo arginina-vasopressina (AVP) do sistema hipotálamo-hipófise, da inibição sináptica baroreflexa para o núcleo trato solitário (NTS), uma das áreas centrais envolvidas na regulação cardiovascular, e, ainda, do aumento da atividade do sistema nervoso simpático [SNS] (Lenkei *et al.*, 1997).

O envolvimento da Ang II nas respostas cardiovasculares tem sido amplamente estudado. As rotas aferentes que levam a informação do sistema cardiovascular ao SNC iniciam nos receptores periféricos que respondem às mudanças do estado cardiovascular. Estes receptores incluem os baroreceptores (receptores de pressão) localizados nas paredes do seio carotídeo e arco aórtico, e os cardiopulmonares (receptores de estiramento). A despolarização das fibras sensoriais que compõem a estrutura destes receptores promove o envio de informações relacionadas com a pressão do sangue contra a parede das artérias (receptores do seio carotídeo e arco aórtico) e com o volume sangüíneo total ou retorno venoso (receptores cardiopulmonares) (Spyer, 1994; Buccafusco, 1996).

Trabalhos que relacionam a ação da Ang II com a manutenção da hipertensão têm demonstrado, por técnica de autoradiografia, que ratos espontaneamente hipertensos (SHR) apresentam aumento da densidade dos receptores de Ang II em várias áreas centrais, porém de forma mais significativa em NTS, quando comparados com ratos normotensos

(Plunkett & Saavedra, 1985). Experimentos realizados em camundongos mutantes, com ausência do gene que codifica o receptor  $AT_2$ , demonstraram um significativo aumento da pressão arterial destes animais em resposta à administração intravenosa (iv) de Ang II (Ichiki *et al.*, 1995), comprovando que o receptor  $AT_1$  é o principal responsável pelo aumento da pressão arterial sistêmica (Keaton & Clark, 1998). Dados mais específicos mostraram a existência de RNAm para o receptor  $AT_{1A}$  em áreas centrais envolvidas com o equilíbrio hidreletrolítico, e controle cardiovascular e neuroendócrino, tais como SFO e hipotálamo anterior, entre outras (Lenkei, Corvol & Llorens-Cortes, 1995). Em estudo autoradiográfico, a administração iv do antisense oligonucleotídeo para o receptor  $AT_{1A}$  ( $AT_1R$ -AS-ODN) promoveu a diminuição da densidade do receptor  $AT_{1A}$  em aorta torácica, artéria mesentérica, medula e córtex renal, em ratos com hipertensão induzida pelo modelo 2R/1C, na fase aguda da hipertensão renovascular, atenuando os efeitos vasoconstritores do aumento plasmático da Ang II e promovendo natriurese; a redução da densidade do receptor  $AT_{1A}$  induziu perda de sódio e redução do volume extracelular contribuindo para o efeito antihipertensivo do tratamento com  $AT_1R$ -AS-ODN em ratos 2R/1C (Galli & Phillips, 2001). Portanto, os dados acima comprovam a participação da Ang II no controle da pressão arterial através do receptor  $AT_1$ .

Os sistemas centrais reguladores da pressão sangüínea parecem estar funcionalmente relacionados com os sistemas de modulação do comportamento sexual. Como mencionado anteriormente, em humanos, a pressão arterial elevada está associada com disfunções sexuais.

#### **4.3. Angiotensina II e função reprodutiva**

A Ang II pode afetar a expressão dos hormônios que regulam a função reprodutiva tanto de machos como de fêmeas (Steele, Gallo & Ganong, 1985; Steele & Ganong, 1986; Khanum & Dufau, 1988; Clark, 1989; Ganong, 1995; Dornelles & Franci, 1998*ab*). Neste contexto, a maioria dos trabalhos existentes focaliza o efeito da Ang II sobre a secreção do LH e PRL (Steele, Gallo & Ganong, 1983; Enjalbert *et al.*, 1986; Franci, Anselmo-Franci & McCann, 1990; Steele & Myers, 1990; Palmer *et al.*, 1994; Dornelles & Franci, 1998*ab*).

A Ang II facilita a secreção de LH por ação indireta na APOM, via *locus coeruleus*, ou ação direta na adenohipófise, ou por combinação de ambas as ações. Em *locus coeruleus*, a Ang II promove a secreção de noradrenalina endógena que estimula os receptores alfa-adrenérgicos da APOM promovendo a liberação de LHRH (ver revisão de Saavedra, 1992) — o modelo experimental de lesão eletrolítica em *locus coeruleus* aumentou o conteúdo de LHRH na APOM e na eminência mediana em ratas em proestro ou OVXs e tratadas com estradiol e progesterona, comprovando a participação do *locus coeruleus* na secreção de LHRH (Helena, Franci & Anselmo-Franci, 2002; Martins-Afféri *et al.*, 2003). Na adenohipófise, a Ang II age sobre os gonadotrofos promovendo a secreção de LH (Franci, Anselmo-Franci & McCann, 1990; Wright & Harding, 1992; Palmer *et al.*, 1994; Dornelles & Franci, 1998*ab*).

Quanto à secreção de PRL, a Ang II central (Myers & Steele, 1991) ou periférica (Aguilera, Hyde & Catt, 1982) pode contribuir para a regulação fisiológica deste hormônio. Na adenohipófise, a Ang II local estimula a secreção de PRL (Steele, Negro-Vilar & McCann, 1981; Aguilera, Hyde & Catt, 1982; Stelle & Myers, 1990). Por outro lado, a Ang II central possui efeito inibitório sobre a secreção de PRL (Steele, McCann & Negro-Vilar, 1982; Myers & Stelle, 1991) através da liberação de dopamina, que ocorre

com a ativação de receptores  $AT_{1A}$  em neurônios dopaminérgicos no núcleo arqueado (ARQ) (Mounzih *et al.*, 1994; Jöhren *et al.*, 1997). Trabalhos prévios mostraram que um aumento agudo nas concentrações de dopamina no ARQ, após injeção icv de Ang II, reduz a secreção de PRL (Steele, McCann & Negro-Vilar, 1982; Seltzer *et al.*, 1993). Terminais nervosos contendo Ang II apresentam-se em íntima localização com corpos celulares dopaminérgicos no ARQ, sendo este, talvez, o motivo da inibição da secreção de PRL (Mounzih *et al.*, 1994). Além disso, o bloqueio central dos receptores de Ang II promove aumento considerável na PRL plasmática (Myers & Steele, 1991; Steele, 1992), sugerindo que a Ang II central parece ter um efeito limitante na magnitude da resposta da PRL.

A ação da Ang II na regulação da função reprodutiva não se limita aos efeitos descritos em áreas centrais e adenohipófise. Nas gônadas masculina a existência de uma enzima imunoreativa semelhante à renina e de RNAm para renina nas células de Leydig indica a presença de um SRA testicular (Parmentier *et al.*, 1983; Deschepper *et al.*, 1986). A atividade fisiológica deste sistema facilita a estereoidogênese, espermatogênese e ejaculação em ratos (ver revisão de Speth, Daubert & Grove, 1999).

Contrariando os efeitos positivos da Ang II sobre a função reprodutiva, existem evidências indicando que a Ang II central é inibitória da função sexual de ratos machos, pois sua administração icv suprime a motivação sexual e a função erétil destes animais, levando ao aumento da latência de cópula e do intervalo para reiniciar a monta, efeito que envolve o receptor  $AT_1$  (Keaton & Clark, 1998). Além disto, microinjeções de Ang II diretamente na AMe também reduzem o comportamento sexual de ratos machos, evidenciado pela diminuição tanto da motivação quanto da potência sexual dos animais frente a fêmeas receptivas sexualmente, efeito que envolve os receptores  $AT_1$  e  $AT_2$  nesta

regulação (Breigeiron *et al.*, 2002). Dados comprovam a existência dos receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> na AMe (Tsutsumi & Saavedra, 1991; Halbach & Albrecht, 1998).



***JUSTIFICATIVA***

---

Existe um grande avanço científico nas pesquisas que envolvem hipertensão e alterações cardiovasculares. Entretanto, estudos direcionados à hipertensão e função reprodutiva são escassos e pouco esclarecedores. Neste contexto, torna-se importante investigar os mecanismos que intermedeiam o processo pelo qual a doença hipertensiva causa alteração nos mecanismos de ação e no desfecho do processo reprodutivo. Para isto, uma abordagem do comportamento sexual, de fatores endócrinos e da espermatogênese, pode facilitar o entendimento das disfunções sexuais associadas à doença hipertensiva.

***HIPÓTESE***

---

Evidências da literatura descrevem a existência de uma relação entre doença hipertensiva e impotência sexual.

Baseado nas evidências citadas na introdução de que:

- a hipertensão é um dos fatores que pode promover alterações no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, levando ao prejuízo da função reprodutiva;
- a Ang II aumentada é característica do modelo de hipertensão renovascular (2R/1C);
- a Ang II central inibe o comportamento sexual de ratos machos;
- as alterações plasmáticas de LH, FSH, testosterona e PRL interferem na regulação do comportamento sexual e na espermatogênese; e
- a Ang II modula a secreção de LH, FSH, testosterona e PRL plasmática,

formulou-se a hipótese de que animais submetidos à hipertensão induzida pelo modelo 2R/1C apresentam redução da função reprodutiva.

Para testar se a redução da função reprodutiva é dependente da Ang II e do aumento sustentado da pressão arterial, investigou-se o efeito da hipertensão renovascular (modelo 2R/1C) sobre os parâmetros de comportamento sexual e de espermatogênese, e sobre as concentrações plasmáticas dos hormônios LH, FSH, testosterona e PRL, de ratos machos. Para testar o efeito da Ang II no modelo 2R/1C, independente da doença hipertensiva, utilizou-se o tratamento com o bloqueador de canal de cálcio nifedipina para a obtenção de um animal normotenso sem interferir na síntese aumentada de Ang II, produzida pelo “clipamento” da artéria renal.

## ***OBJETIVOS***

---

### **Objetivo geral**

Testar os efeitos da hipertensão induzida pelo modelo 2R/1C sobre a função reprodutiva de ratos machos.

### **Objetivos específicos**

- Analisar o comportamento sexual, as concentrações plasmáticas de LH, FSH, testosterona e PRL, e a espermatogênese, de ratos machos induzidos à hipertensão pelo modelo 2R/1C;
- Analisar o comportamento sexual, as concentrações plasmáticas de LH, FSH, testosterona e PRL, e a espermatogênese, de ratos machos “clipados” na artéria renal (modelo 2R/1C) e normotensos devido ao tratamento com o bloqueador de canais de cálcio nifedipina.

## ***MATERIAL E MÉTODOS***

---

Os experimentos descritos a seguir foram realizados conforme as normas estabelecidas no Guia para Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do Instituto Nacional da Saúde dos EUA – NIH (1986).

## **1. Animais**

Ratos machos *Wistar* com peso corporal de  $270\text{g} \pm 10$  foram obtidos da colônia do Biotério Central da Universidade Federal de Rio Grande do Sul e adaptados às condições do Biotério do Laboratório de Neuroendocrinologia do Comportamento.

Os animais foram colocados em caixas-residência de tamanho  $60 \times 50 \times 30\text{cm}$ , ambientados com temperatura constante de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , sob um ciclo claro-escuro de 12/12h com início às 6:00h, ração e água *ad libitum*.

## **2. Iniciação da experiência sexual dos ratos machos**

Ratos machos foram expostos a fêmeas OVXs induzidas à receptividade sexual por reposição hormonal.

A reposição hormonal consistiu em duas injeções intramusculares: a primeira, contendo 20mg de estradiol (benzo-ginoestril ap<sup>®</sup> 5mg – SARSA) diluído em 0,2mL de óleo mineral/rata, foi aplicada 48h antes da iniciação sexual, e a segunda, contendo uma mistura de 20mg de estradiol + 500mg de progesterona (SIGMA) diluída em 0,2mL de óleo mineral/rata, 6h antes da iniciação sexual (Mas *et al.*, 1987; Padoin *et al.*, 2001; Putnam, Sato & Hull, 2001). Todas as fêmeas OVXs e induzidas ao estro comportamental



por reposição hormonal foram testadas com um macho sexualmente ativo, e somente as que apresentaram comportamento de lordose foram utilizadas no estudo (Padoin *et al.*, 2001).

A reposição hormonal foi realizada por três vezes consecutivas, onde 3 machos/1 fêmea foram mantidos em caixas-residência. Ao término do período de treze dias, segundo protocolo do nosso laboratório, as fêmeas foram retiradas das caixas-residência e os machos permaneceram por mais sete dias em abstinência sexual, quando, então, foram testados para o desempenho sexual (Breigeiron *et al.*, 2002).

### **3. Teste de desempenho sexual**

O teste de desempenho sexual consistiu em avaliar durante dez minutos o comportamento sexual dos machos perante fêmeas OVXs e induzidas ao estro comportamental por reposição hormonal. Os machos que, ao serem colocados perante estas fêmeas, apresentavam seis ou mais montas com intromissão peniana no intervalo de dez minutos, segundo protocolo do nosso laboratório, foram considerados como sexualmente aptos (Breigeiron *et al.*, 2002); os demais não foram utilizados no experimento.

### **4. Preparação do modelo de hipertensão renovascular (2R/1C)**

Após um total de vinte dias entre experiência e abstinência sexual e testagem do desempenho sexual, machos sexualmente aptos e com peso corporal em torno de 300g foram submetidos à cirurgia de “clipamento” da artéria renal esquerda.

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal (ip) de uma mistura de quetamina (Dopalen, Agribrands do Brasil Ltda, Paulínia, SP) na dose de 100mg/kg e de xilazina (Rompum, Bayer S.A., São Paulo, SP) na dose de 50 mg/kg. Inicialmente foi realizada uma incisão mediana na região abdominal com tamanho aproximado de 2cm logo abaixo do apêndice xifóide. A abertura da cavidade abdominal foi realizada em planos. O afastamento de vísceras abdominais foi realizado com o auxílio de dois cotonetes embebidos em solução fisiológica aquecida. O rim esquerdo foi isolado em campo cirúrgico por tiras de algodão embebido em solução fisiológica aquecida. Com o hilo renal identificado, foi iniciado o isolamento da artéria renal esquerda que teve seu diâmetro diminuído com a colocação de um clipe de prata (Ruzicka & Leenen, 1994) de tamanho 2x6mm, dobrado em "V", constituindo um diâmetro interno de 0,28mm. O fechamento da cavidade abdominal foi realizado por planos, sendo que a aponeurose e a pele foram suturadas com fio não-absorvível.

Os animais permaneceram com o clipe renal durante vinte e oito dias, para, após o término deste período, serem submetidos ao registro do comportamento sexual e da PAM. Machos que sofreram o mesmo procedimento cirúrgico com exceção da colocação do clipe de prata na artéria renal serviram como controle (cirurgia fictícia). Machos que, ao final do período de três semanas após a implantação do clipe renal, atingiram peso corporal de  $350g \pm 20$  foram submetidos à inserção de cateter em artéria femoral.

## **5. Cateterização da artéria femoral**

A cateterização da artéria femoral esquerda foi realizada sob o procedimento anestésico descrito acima. O cateter foi confeccionado por uma junção de dois tubos de

polietileno PE-60 e PE-10 (Clay Adams, Parsippany, NJ), sendo o diâmetro menor escolhido para a inserção intra-arterial. O procedimento cirúrgico consistiu em uma incisão longitudinal de aproximadamente 0,6cm de extensão na região inguinal esquerda, afastamento de tecido adjacente, localização da tríade veia-artéria-nervo femoral, isolamento da artéria femoral e abertura parcial da mesma para inserção da extremidade proximal do catéter a ser fixado na própria artéria. O comprimento do catéter que foi introduzido na artéria femoral esquerda correspondeu a uma linha transversa que compreendia o ponto de inserção na artéria até a sínfise púbica. O catéter foi passado por via subcutânea (sc), com o auxílio de um trocater, até a região dorso-cervical por onde sua extremidade distal ficou exposta. A incisão na pele foi suturada com fio não-absorvível. O catéter foi preenchido com solução de heparina (Kirby & Blumberg, 1998) - 60UI/cateter - e sua extremidade distal ocluída com pino de aço de 0,6mm de diâmetro. A solução de heparina foi trocada uma vez por dia durante todo o experimento.

Nos sete dias subseqüentes à cateterização da artéria femoral, os ratos foram acompanhados diariamente pelo pesquisador que avaliou, subjetivamente, as condições perfusionais do membro inferior esquerdo quanto à presença de edema e cianose local. Ao final de uma semana, somente os animais que não apresentaram edema e/ou má perfusão local, e que mantiveram uma adequada função motora do membro em questão e peso corporal igual ou acima do registrado no dia do procedimento cirúrgico foram utilizados para o registro do comportamento sexual e da PAM, sendo os demais não utilizados no experimento.

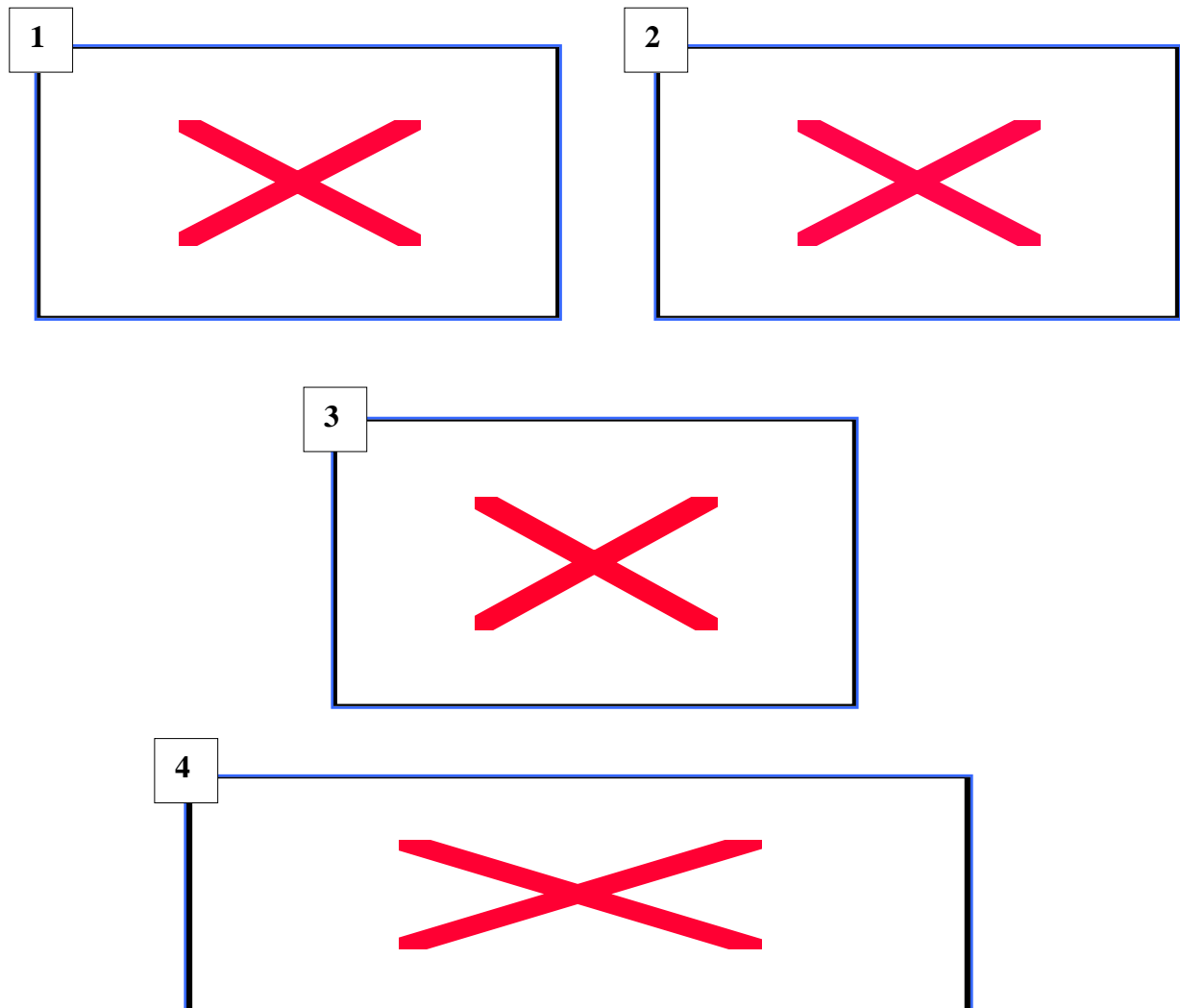
## **6. Comportamento sexual**

## 6.1. Parâmetros comportamentais analisados

Os parâmetros comportamentais analisados foram: monta com intromissão, ejaculação e intervalo pós-ejaculatório. A descrição destes parâmetros baseia-se em trabalhos prévios (Agmo, 1997; Breigeiron *et al.*, 2002):

- *Monta com intromissão*: o macho posiciona-se por detrás da fêmea, coloca suas patas dianteiras sobre a região dorsal da mesma, abraçando-a e massageando-a na região lateral do abdômen, e realiza sucessivos movimentos pélvicos de aproximação dos flancos. Logo após o macho afasta-se rapidamente da fêmea apresentando um movimento característico tipo "saída em mola", precedido de um rápido movimento de abdução das patas dianteiras;
- *Ejaculação*: após sucessivas montas com e sem intromissão, o macho realiza uma monta com intromissão peniana em que permanece maior tempo abraçado à fêmea. Após, o macho afasta-se da fêmea em movimento tipo "saída em mola", porém fica alguns segundos em posição de congelamento com as patas dianteiras abduzidas;
- *Intervalo pós-ejaculatório*: após a ejaculação o macho fica sexualmente inativo até que ocorra uma nova monta com ou sem intromissão.

Parâmetros comportamentais:



**Figura 2:** Parâmetros comportamentais obtidos da filmagem em vídeo de um casal de ratos durante o registro do comportamento sexual. Em (1) monta com intromissão (I) - movimentos pélvicos de aproximação dos flancos; (2) monta com intromissão (II) - “saída em mola” com abdução das patas dianteiras; (3) ejaculação – maior tempo abraçado à fêmea; e (4) intervalo pós-ejaculatório – inatividade sexual. A seta refere-se ao macho.

## **6.2. Registro do comportamento sexual de ratos machos**

Completados vinte e sete dias de “clipamento” da artéria renal e seis dias da cateterização femoral, foi registrado o comportamento sexual em um intervalo de uma a seis horas após início da fase escura do ciclo claro-escuro. Inicialmente, o macho era retirado da caixa-residência e colocado na caixa-observação por um período de vinte minutos para adaptação ao novo ambiente. A caixa-observação, com dimensões de 70x70x35cm e parede frontal de vidro, permitia a ampla visualização do animal. Passado o período de adaptação, uma fêmea OVX, induzida ao estro comportamental por reposição hormonal, foi colocada com o macho, iniciando-se, imediatamente a seguir, a sessão de registro do comportamento sexual. Os animais foram filmados com uma filmadora de vídeo. Ao término do registro, o filme foi visualizado com o auxílio de um vídeo-cassete, televisão e um programa para registro de dados comportamentais (programa para avaliação de tempos). Um observador treinado utilizou o programa para computar a frequência, a latência e a duração dos comportamentos.

A frequência é o número de ocorrências de um determinado comportamento durante o registro; a latência, o tempo em segundos transcorridos desde um marco inicial até a primeira ocorrência do comportamento; e a duração, o tempo total de ocorrência de um comportamento específico (Agmo, 1997).

Neste estudo, a frequência e a latência do comportamento de monta com intromissão foram computadas por dez minutos. Quando a monta com intromissão não era observada durante o registro (frequência igual a zero), foi computado como latência de 600 segundos, correspondentes ao tempo de dez minutos (Breigeiron *et al.*, 2002).

A ejaculação foi registrada durante um período máximo de trinta minutos. Se a ejaculação não ocorria durante este período, a latência de 1800s era computada para este animal, correspondentes ao tempo de trinta minutos (Breigeiron *et al.*, 2002).

Para a duração do intervalo pós-ejaculatório foram analisados somente os animais que ejacularam.

## **7. Registro da pressão arterial média (PAM)**

O registro da PAM foi realizado na fase clara do ciclo claro-escuro, na manhã seguinte ao registro do comportamento sexual. Para o registro da PAM, os animais foram adaptados durante uma hora na sala de registro, considerada como um novo ambiente. Passado este intervalo de adaptação, o pino de aço foi retirado e, a seguir, verificadas as condições de perfusão do catéter. A extremidade distal do catéter foi acoplada a um transdutor de pressão (TSD 104A; Biopac Systems), e os registros foram realizados por um sistema de aquisição de dados (Biopac Systems MP 100, Santa Bárbara, CA) utilizando-se o *software* Acknowledge (Biopac Systems).

Antes de cada animal ser registrado, o sistema foi calibrado utilizando-se um manômetro de pressão com resolução de 1mmHg. Durante o registro, que teve duração de vinte minutos, os animais ficaram livres para locomoção.

O valor analisado da PAM/rato correspondeu ao valor da média da PAMs detectadas nos trinta segundos subseqüentes a contar do 15º minuto do registro.

## **8. Coleta sanguínea**

Imediatamente após o final do registro da PAM, os animais foram mortos por decapitação e sangue troncular foi coletado em funis e tubos previamente heparinizados. O sangue foi centrifugado a 3000rpm a 4°C, por vinte minutos, e o plasma isolado e estocado à -20°C para procedimento de radioimunoensaio.

## **9. Radioimunoensaio**

As concentrações plasmáticas de LH, FSH, testosterona e PRL (ng/mL) foram realizadas por técnicas de radioimunoensaio no laboratório do Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci, na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Brasil). Neste mesmo laboratório, foi produzido o segundo anticorpo em cabra contra gama globulina de coelho, utilizado para precipitação do complexo hormônio-anticorpo específico, e também foram iodinados e purificados LH, FSH e PRL utilizados como traçadores nos ensaios. A testosterona foi extraída em éter etílico antes da determinação por radioimunoensaio que utilizou [1,2,6,7]<sup>3</sup>H-testosterona obtida junto à *New England Nuclear* (USA), anticorpo específico cedido pelo Dr José Antunes Rodrigues (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP) e hormônio padrão da Sigma Co. (USA). A separação do complexo testosterona-anticorpo específico utilizou uma amostra de carvão-dextrana (NontA & Sigma, USA) e a leitura das amostras foi realizada em líquido de cintilação biodegradável (Perkim-Helmer, USA).

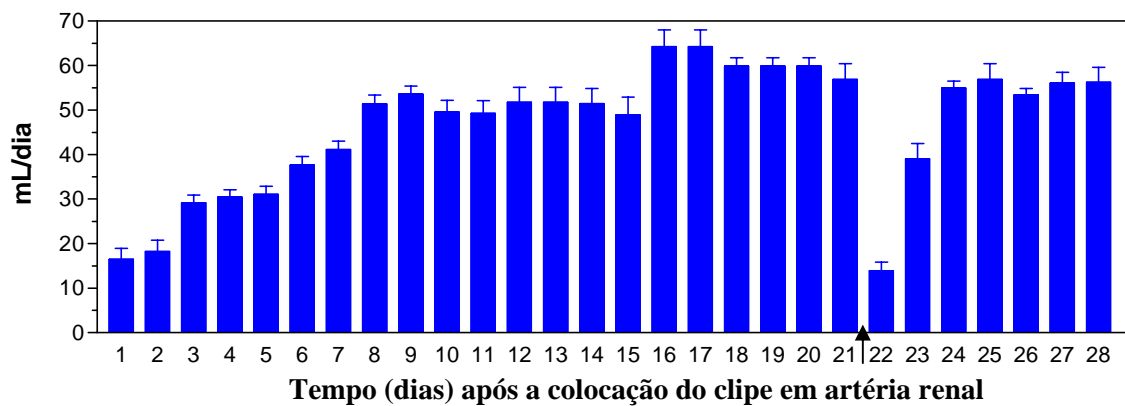
Todas as amostras foram dosadas em duplicata num mesmo ensaio. Os erros intra-ensaio para LH, FSH, PRL e testosterona foram: 4%; 3,2%; 3,5% e 4,5%, enquanto as doses mínimas detectáveis foram: 0,05; 0,2; 0,2 e 0,03 ng/mL, respectivamente.



## **10. Administração do bloqueador de canais de cálcio nifedipina**

No primeiro dia após o “clipamento” da artéria renal, os ratos foram submetidos à administração oral com uma solução de nifedipina (NIF) (ACROS Organics – New Jersey – USA) 10 mg/kg/dia em água de beber (Hurtado *et al.*, 2002) durante um período de vinte e oito dias. Os ratos foram pesados a cada 48h para o reajuste das doses da solução de nifedipina a serem administradas. As alíquotas de NIF (17 mg) [Synth – Diadema - SP], previamente pesadas, foram dissolvidas em 3 mL de veículo [polietilenoglicol 400 USP - PEG 400 (2mL) e etanol (1mL); USP DI, 1997] (Budavari *et al.*, 1996; Mohri, Uesawa & Sagawa, 2000) e, subseqüentemente, em água de beber. Os recipientes contendo a solução foram cobertos com papel alumínio, devido à fotossensibilidade da NIF (Brilla, 2000). A solução foi trocada a cada 24h, sempre no horário da 8:00h, permitindo, assim, o acompanhamento da quantidade administrada/dia/rato. Se por três dias consecutivos o animal não ingerisse a quantidade total da solução (mL/dia) oferecida, este era retirado do experimento. Durante o tempo de administração da droga, os animais permaneceram sozinhos nas caixas-residência.

A quantidade da solução (mL/dia) oferecida aos animais teve como base, uma curva de ingestão hídrica diária feita em experimento anterior com animais 2R/1C, considerando os efeitos do procedimento cirúrgico e as alterações hemodinâmicas da hipertensão renovascular, como mostra o gráfico a seguir:



**Figura 3:** Curva de ingestão hídrica de ratos machos 2R/1C ( $n=10$ ). No dia 1 foi realizada a cirurgia de “clipamento” da artéria renal e, entre os dias 21 e 22 (seta), a cirurgia de cateterismo da artéria femoral. O volume de água dos recipientes/rato foi medido individualmente com o auxílio de um copo graduado, subtraindo-se o volume anterior das 24h pelo volume constatado no momento. O valor desta subtração correspondeu ao volume ingerido nas vinte e quatro horas/rato. O procedimento de aferição do volume ingerido/animal foi realizado uma vez por dia, às 8:00h, durante 28 dias.

## 11. Aferição do peso corporal e do peso renal

Momentos antes do animal ser decapitado, foi aferido seu peso corporal. Após a decapitação, os rins foram removidos, pesados separadamente (peso fresco), e desprezados. O valor do peso corporal (g) e do peso renal (g) foi aferido em balança própria para posterior estimativa da razão entre peso renal e peso corporal.

Após os vinte e oito dias de “clipamento” da artéria renal, a presença do clipe, a alteração do tamanho renal, tanto do rim “clipado” como do rim “não-clipado”, e a

ausência de tecido necrótico no parênquima renal, visualmente observada, foram critérios de permanência dos animais no estudo.

## **12. Avaliação da espermatogênese**

### **12.1. Produção e maturação espermática**

Os testículos e epidídimos direitos foram retirados, pesados, congelados em gelo seco e armazenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  para posterior estimativa do quociente espermático e do trânsito epidimário.

### **12.2. Quantidade de espermátides no testículo**

Após a túnica albugínea ser removida, o parênquima testicular foi homogeneizado e sonicado em 8mL de uma solução contendo NaCl (0,9%) e Triton X - 100 (0,05%). Para avaliação da quantidade espermática, alíquotas de 100 $\mu\text{L}$  do homogeneizado foram diluídas em 900 $\mu\text{L}$  da solução citada acima, sendo as espermátides resistentes à homogeneização e sonicagem (estágio 19 da espermiogênese) foram contadas em câmara de *Neubauer* própria.

### **12.3. Quantidade de espermatozóides no epidídimo**

O epidídimo direito foi dividido nas unidades cabeça-corpo e cauda, que em seguida foram pesadas, homogeneizadas e sonicadas, separadamente, segundo o mesmo

protocolo empregado para a estimativa da quantidade de espermátides/testículo. Alíquotas de 50µL foram diluídas em 950µL de solução contendo Triton X-100 (0,05%) para contagem dos espermatozóides/unidade em câmara de *Neubauer* própria.

#### 12.4. Cálculo da produção espermática diária (PED) e trânsito epidimário (TE)

Após a contagem das espermátides no testículo, o valor encontrado foi dividido pelo peso do parênquima testicular para a obtenção do quociente espermático/testículo (QE). O resultado do QE foi dividido por 6,1 (número de dias que as espermátides no estágio 19 permanecem nos túbulos seminíferos) (Robb, Amann & Killian, 1978; Mazaro *et al.*, 2000). O resultado desta divisão é igual a PED.

A determinação da PED foi necessária para o cálculo do TE.

Após a contagem dos espermatozóides em cabeça-cauda e corpo do epidídimo, o valor encontrado/unidade foi dividido pelo peso do parênquima epidimário da respectiva unidade, obtendo-se a concentração de espermatozóides (CE) separadamente da cabeça-corpo e da cauda do epidídimo. Para calcular o TE/unidade ao longo do ducto epidimário, o valor referente à CE foi dividido pelo respectivo valor da PED (Zenick *et al.*, 1994). Para o cálculo do TE total, foram somados os valores do TE da cabeça-corpo e da cauda do epidídimo.

Portanto,

$$\text{QE} = \frac{\text{quantidade de espermátides}}{\text{peso do parênquima testicular}}$$

Então,

$$\mathbf{PED} = \frac{\mathbf{QE}}{6,1}$$

Portanto,

$$\mathbf{CE} = \frac{\text{quantidade de espermatozoides}}{\text{peso do parênquima do epidídimo}}$$

Assim,

$$\mathbf{TE} = \frac{\mathbf{CE}}{\mathbf{PED}}$$

O QE e o TE total foram utilizados como referência para a avaliação da espermatogênese neste estudo.

### **13. Desenho experimental**

Os experimentos foram divididos como se seguem:

#### **13.1. Experimento I - Avaliação da função reprodutiva de ratos machos induzidos à hipertensão pelo modelo 2R/1C.**

Animais sexualmente avaliados pelo teste de desempenho sexual foram submetidos à cirurgia fictícia ou à cirurgia de 2R/1C. Os animais foram divididos em dois grupos: fictício (**FICT**);  $n=23$ : ratos machos normotensos submetidos ao procedimento cirúrgico do modelo 2R/1C, com exceção da colocação efetiva do clipe de prata na artéria renal; e **2R/1C**;  $n=23$ : ratos machos com hipertensão induzida pelo modelo 2R/1C.

Após vinte e um dias da cirurgia fictícia ou da cirurgia 2R/1C, os animais foram cateterizados na artéria femoral. Passados seis dias deste procedimento cirúrgico, foram registrados o comportamento sexual e, na manhã seguinte, a PAM. O sangue foi coletado para a dosagem das concentrações plasmáticas hormonais, e o testículo-epidídimo retirado para a avaliação dos parâmetros de função gonadal. Os rins foram retirados para a aferição do peso renal.

Após vinte e oito dias do “clipamento” da artéria renal ou da cirurgia fictícia, foram utilizados dezesseis animais no grupo FICT e vinte animais no grupo 2R/1C para calcular a razão entre o peso renal e o peso corporal, e onze animais/grupo para a avaliação da espermatogênese. Nos demais procedimentos, foi utilizado o número total de animais/grupo.

##### **13.1.1. Objetivo**

Testar o efeito da hipertensão induzida pelo modelo 2R/1C sobre a função reprodutiva de ratos machos.

### **13.1.2. Análise estatística**

A análise estatística foi realizada entre os dois grupos: 2R/1C e fictício. Os dados paramétricos (frequência da monta com intromissão e duração do intervalo pós-ejaculatório; PAM; concentrações plasmáticas de LH, FSH, testosterona e PRL; quociente espermático; trânsito epididimário e peso renal/peso corporal) foram analisados pelo teste *t-Student*, considerando as diferenças significativas entre as médias ( $\pm$ E.P.M.). Dados não-paramétricos (latência da monta com intromissão e da ejaculação) foram analisados pelo teste *Mann-Whitney*. A porcentagem de animais que ejacularam ou apresentaram intervalo pós-ejaculatório foi comparada pelo teste Qui-quadrado. As diferenças consideradas estatisticamente significativas apresentaram uma probabilidade menor do que 5%. As análises foram realizadas utilizando o programa SPSS 12.0. Os gráficos foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism 3.03.

### **13.2. Experimento II - Avaliação da função reprodutiva de ratos machos submetidos à cirurgia fictícia ou ao modelo 2R/1C e tratados com o bloqueador de canais de cálcio nifedipina.**

Animais sexualmente avaliados pelo teste de desempenho sexual foram divididos em quatro grupos: fictício (**FICT**) +**V**;  $n=10$ : ratos machos submetidos à cirurgia fictícia, com uso de veículo (V) [PEG 400 + etanol]; fictício (**FICT**) +**N**;  $n=13$ : ratos machos submetidos à cirurgia fictícia e tratados com uma mistura de veículo e nifedipina

(10mg/kg/rato); **2R/1C+V**;  $n=14$ : ratos machos submetidos à cirurgia 2R/1C, com uso de veículo (V) [PEG 400 + etanol]; e **2R/1C+N**;  $n=16$ : ratos machos submetidos à cirurgia 2R/1C e tratados com uma mistura de veículo e nifedipina (10mg/kg/rato). Os quatro grupos receberam veículo ou veículo e nifedipina, diluídos em água de beber, durante todo o experimento.

Após vinte e um dias do “clipamento” da artéria renal, os animais foram cateterizados na artéria femoral. Passados seis dias deste procedimento cirúrgico, foram registrados o comportamento sexual e, na manhã seguinte, a PAM. O sangue foi coletado para a dosagem das concentrações plasmáticas hormonais, e o testículo-epidídimo retirado para a avaliação dos parâmetros de função gonadal. Os rins foram retirados para a aferição do peso renal.

Após vinte e oito dias do “clipamento” da artéria renal ou da cirurgia fictícia, o número de animais/grupo utilizado para calcular a razão entre o peso renal e o peso corporal foi: FICT+V ( $n=7$ ); FICT+N ( $n=7$ ); 2R/1C+V ( $n=9$ ) e 2R/1C+N ( $n=11$ ); para a avaliação da espermatogênese foi: FICT+V ( $n=10$ ); FICT+N ( $n=10$ ); 2R/1C+V ( $n=7$ ) e 2R/1C+N ( $n=9$ ); e para a dosagem da testosterona: 2R/1C+V ( $n=8$ ) e 2R/1C+N ( $n=11$ ). Nos demais procedimentos, foi utilizado o número total de animais/grupo.

### **13.2.1. Objetivo**

Testar o efeito do “clipamento” da artéria renal (modelo 2R/1C) sobre a função reprodutiva de ratos machos com pressão arterial normal devido ao tratamento com o bloqueador de canais de cálcio nifedipina.

### **13.2.2. Análise estatística**



Os grupos utilizados foram: FICT+V, FICT+N, 2R/1C+V e 2R/1C+N. A análise dos dados foi realizada considerando os efeitos principais: presença do clipe e tratamento com nifedipina.

Para os dados de frequência da monta com intromissão e duração do intervalo pós-ejaculatório; PAM; concentrações plasmáticas de LH, FSH, testosterona e PRL; quociente espermático; trânsito epidimário e peso renal/peso corporal foi utilizada a ANOVA de duas vias considerando as diferenças significativas entre as médias ( $\pm$ E.P.M.). Para as variáveis: frequência de monta com intromissão e concentrações plasmáticas de LH, FSH, testosterona e PRL, foi realizada a transformação logarítma antes da ANOVA. O teste de comparações múltiplas *Newman-Keuls* foi utilizado somente na ocorrência de diferença significativa na interação entre os efeitos principais para identificação do(s) grupo(s) em que ocorre a diferença.

Para os dados de latência da monta com intromissão e da ejaculação foi utilizado o teste *Kruskal-Wallis* para os efeitos principais, considerando as diferenças significativas entre as medianas (intervalo interquartil). O teste de comparações múltiplas *Dunn (post-hoc)* foi utilizado somente na ocorrência de diferença significativa na interação entre os efeitos principais para identificação do(s) grupo(s) em que ocorre a diferença.

A porcentagem de animais que ejacularam ou apresentaram intervalo pós-ejaculatório foi comparada pelo teste Qui-quadrado.

As diferenças consideradas estatisticamente significativas apresentaram uma probabilidade menor do que 5%. As análises foram realizadas utilizando o programa SPSS 12.0. Os gráficos foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism 3.03.

#### 14. Resumo do protocolo experimental

<b>DIAS</b>	<b>EVENTOS</b>
1°-13°	Padronização do peso corporal dos machos (270g±10). Machos e fêmeas (OVX e induzidas ao estro comportamental por reposição hormonal) foram colocados em caixas-residência (3 machos/1 fêmea) para experiência sexual.
14°-20°	Fêmeas foram retiradas das caixas-residência. Machos sem contato com fêmeas (período de abstinência sexual).
21°	Noite - Machos foram avaliados pelo desempenho sexual. Fêmeas OVXs e induzidas ao estro comportamental por reposição hormonal foram utilizadas para o teste.
22°	Ratos considerados sexualmente aptos foram submetidos à cirurgia de “clipamento” da artéria renal esquerda (com ou sem clipe). Para os animais pertencentes ao experimento II, iniciou-se a administração oral de nifedipina (10 mg/kg/rato) ou veículo.
43°	Ratos com peso corporal 350g±20 foram submetidos à cirurgia de cateterização da artéria femoral.
49°	Noite – registro do comportamento sexual. Fêmeas OVXs e induzidas ao estro comportamental por reposição hormonal foram utilizadas para o registro.
50°	Manhã – registro da PAM. Os animais foram decapitados; o sangue foi coletado, o testículo-epidídimo retirado e os rins pesados.

## ***RESULTADOS***

---

## 1. Expressão dos resultados

Os resultados mostrados a seguir estão expressos da seguinte forma:

Para o comportamento sexual, os resultados são descritos numericamente em frequência, latência e duração dos comportamentos, sendo que algumas observações devem ser feitas:

- os valores relativos à frequência de monta com intromissão estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) do número de vezes que o comportamento acontecia em um intervalo de tempo de dez minutos (600s).

- os valores relativos às latências estão expressos como mediana e intervalo interquartil. A latência da monta com intromissão foi considerada o intervalo de tempo de dez minutos (600s) desde o início do registro até a ocorrência do respectivo comportamento; a latência de ejaculação foi considerada o intervalo de tempo de trinta minutos (1800s) desde a primeira monta com intromissão até a ocorrência da ejaculação (Breigeiron *et al.*, 2002).

- os valores relativos à duração do intervalo pós-ejaculatório estão expressos como a média  $\pm$  EPM e correspondem ao intervalo desde a ejaculação até a monta com ou sem intromissão subsequente, considerando um intervalo máximo de trinta minutos (1800s) a contar da ejaculação (Breigeiron *et al.*, 2002).

Os resultados referentes ao comportamento sexual são mostrados em tabelas, sendo que os valores referentes aos efeitos principais (presença do clipe e uso da nifedipina) para frequência de monta com intromissão e duração do intervalo pós-ejaculatório são expressos como média  $\pm$  EPM dos valores obtidos, porém não são tabelados.

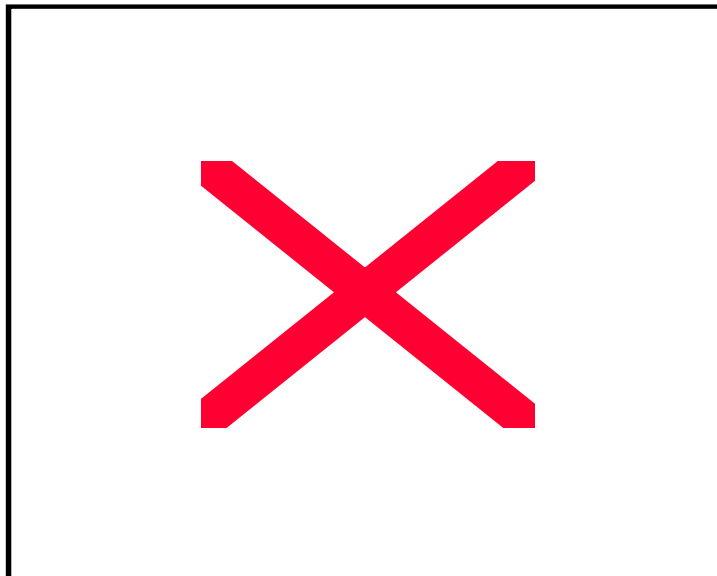
Os resultados de PAM, concentrações plasmáticas de LH, FSH, testosterona e PRL, espermatogênese, e peso renal/peso corporal estão expressos numericamente como a média±EPM dos valores obtidos e são demonstrados em gráficos. Os valores referentes aos efeitos principais (presença do clipe e uso da nifedipina) para PAM, concentrações plasmáticas de LH, FSH, testosterona e PRL, espermatogênese, e peso renal/peso corporal são expressos como média±EPM dos valores obtidos, porém não são mostrados graficamente.

## 2. Experimentos

### 2.1. Experimento I - Avaliação da função reprodutiva de ratos machos induzidos à hipertensão pelo modelo 2R/1C.

#### 2.1.1. Pressão Arterial Média (PAM)

A Figura 4 representa a PAM (mmHg). Houve um aumento significativo da PAM de 41,4% no grupo 2R/1C ( $127,0 \pm 2,2$ ) quando comparado ao grupo fictício ( $89,8 \pm 1,8$ ); ( $t= 13,03$ ;  $P < 0,0001$ ).

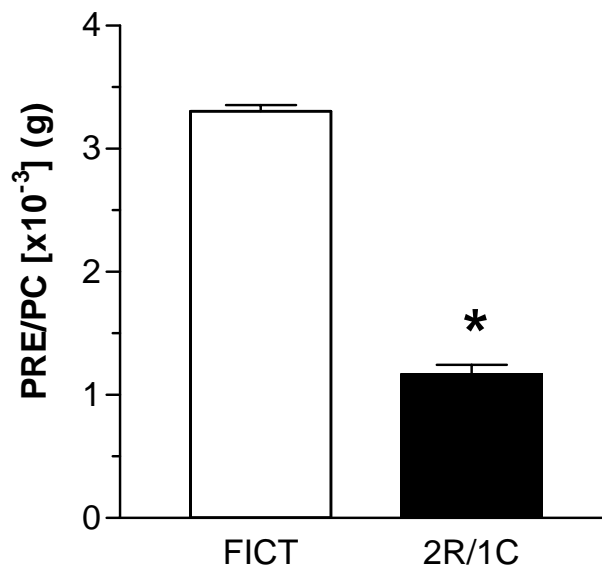


**Figura 4.** PAM (mmHg) de ratos machos após vinte e oito dias de cirurgia fictícia (FICT;  $n=23$ ) ou “clipamento” da artéria renal (2R/1C;  $n=23$ ). Os valores correspondem à média das PAMs detectadas nos trinta segundos subsequentes a contar do 15º minuto do registro. Para a aquisição dos dados, foi utilizado o sistema Acknowledge/BIOPAC. Os dados foram analisados pelo teste *t-Student*. Os valores da análise estão expressos como média $\pm$ EPM. \* $P < 0,0001$ .

## 2.1.2. Peso renal/peso corporal

### 2.1.2.1. Peso renal esquerdo/peso corporal

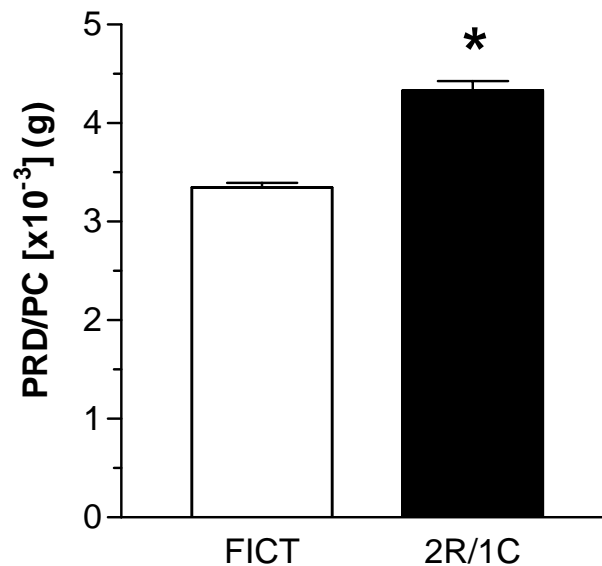
A Figura 5 representa o peso renal esquerdo/peso corporal [PRE/PC ( $\times 10^{-3}$ g)]. Houve uma redução significativa de 63,6% no PRE/PC no grupo 2R/1C ( $1,2 \pm 0,1$ ) quando comparado ao grupo fictício ( $3,3 \pm 0,05$ ); ( $t = 22,17$ ;  $P < 0,0001$ ).



**Figura 5.** Peso renal esquerdo/peso corporal [PRE/PC ( $\times 10^{-3}$ g)] de ratos machos após vinte e oito dias de cirurgia fictícia (FICT;  $n=16$ ) ou “clipamento” da artéria renal (2R/1C;  $n=20$ ). Os valores obtidos referem-se à razão entre o peso renal esquerdo e o peso corporal. Os dados foram analisados pelo teste *t-Student*. Os valores da análise estão expressos como média $\pm$ EPM. \*  $P < 0,0001$ .

### 2.1.2.2. Peso renal direito/peso corporal

A Figura 6 representa o peso renal direito/peso corporal [PRD/PC ( $\times 10^{-3}$ g)]. Houve um aumento significativo de 30,3% no PRD/PC no grupo 2R/1C ( $4,3 \pm 0,1$ ) quando comparado ao grupo fictício ( $3,3 \pm 0,05$ ); ( $t = 8,60$ ;  $P < 0,0001$ ).



**Figura 6.** Peso renal direito/peso corporal [PRD/PC ( $\times 10^{-3}$ g)] de ratos machos após vinte e oito dias de cirurgia fictícia (FICT;  $n=16$ ) ou “clipamento” da artéria renal (2R/1C;  $n=20$ ). Os valores obtidos referem-se à razão entre o peso renal direito e o peso corporal. Os dados foram analisados pelo teste *t-Student*. Os valores da análise estão expressos como média $\pm$ EPM. \*  $P < 0,0001$ .



### 2.1.3. Comportamento Sexual

A Tabela 1 mostra a frequência de monta com intromissão ( $n^{\circ}/10\text{min}$ ), latência de monta com intromissão (s), latência de ejaculação (s) e intervalo pós-ejaculatório (s), como também, o número de animais que executou ejaculação e apresentou intervalo pós-ejaculatório (%) dos grupos: fictício e 2R/1C.

Na comparação entre os grupos, os animais do grupo 2R/1C apresentaram uma redução significativa de 45,4% na frequência de monta com intromissão ( $t= 4,73$ ;  $P<0,0001$ ) e um aumento significativo de 223,8% na latência de monta com intromissão ( $U= 71,50$ ;  $P<0,0001$ ), de 227,3% na latência de ejaculação ( $U= 34,00$ ;  $P<0,0001$ ) e de 139,5% no intervalo pós-ejaculatório ( $t= 3,64$ ;  $P<0,001$ ) quando comparados aos animais do grupo fictício.

O teste Qui-quadrado mostrou que no grupo 2R/1C houve uma redução significativa de 43,5% no número de animais que ejacularam ( $\chi^2=12,78$ ;  $P<0,0005$ ) e de 23% no número de animais que apresentaram intervalo pós-ejaculatório ( $\chi^2=5,79$ ;  $P<0,02$ ) quando comparado ao grupo fictício.

No grupo 2R/1C, de um total de 23 animais, 13 apresentaram ejaculação e, destes, 10 mostraram intervalo pós-ejaculatório. No grupo fictício, todos os animais apresentaram ejaculação e intervalo pós-ejaculatório.

Comportamento sexual de ratos machos submetidos à cirurgia fictícia e ao modelo 2R/1C.

ITENS COMPORTAMENTAIS	FICT	2R/1C
Frequência de monta com intromissão (nº/10 min)	9,7 ± 0,7	5,3 ± 0,7*
Latência de monta com intromissão (s)	21,0 (12,0 / 54,0)	68,0 (56,5 / 363,0)*
Latência de ejaculação(s)	526,0 (437,5 / 983,5)	1722,0 (1296,0 / 1800,0)*
Animais que ejacularam (%)	100 (23/23)	56,5 (13/23)*
Intervalo pós-ejaculatório(s)	322,3 ± 12,0	772,0 ± 164,6*
Animais que apresentaram período pós-ejaculatório (%)	100 (23/23)	77 (10/13)*

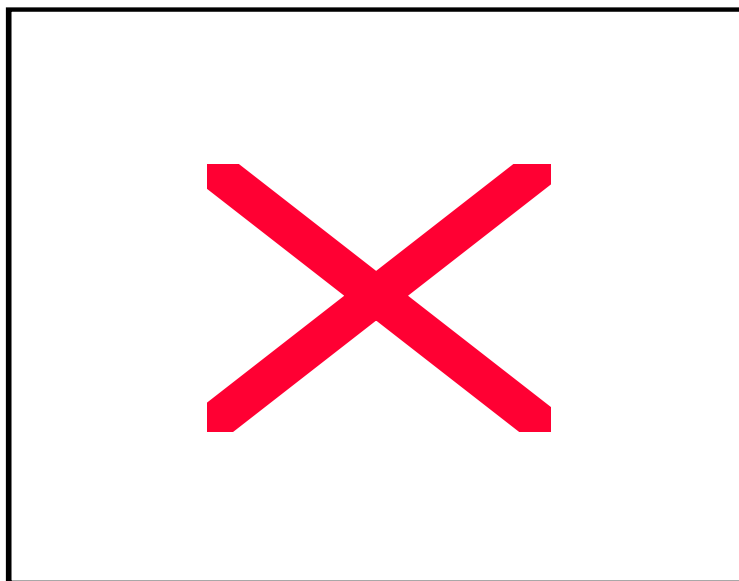
**Tabela 1.** Comportamento sexual de ratos machos após vinte e oito dias de cirurgia fictícia (FICT;  $n=23$ ) ou “clipamento” da artéria renal (2R/1C;  $n=23$ ). A frequência e a latência da monta com intromissão foram obtidas em sessões de observação de 10 min. A latência da ejaculação foi obtida em sessões de observação de 30 min após a primeira monta com intromissão. A duração do intervalo pós-ejaculatório foi obtida considerando um novo período de observação de 30 min a contar da ejaculação. Foi utilizado o teste *t-Student* para frequência de monta com intromissão (nº/10 min) e duração do intervalo pós-ejaculatório; os valores estão expressos com média±EPM. Para latência (s) de monta

com intromissão e de ejaculação, foi utilizado o teste *Mann-Whitney*; os valores estão expressos como mediana (intervalo interquartil). Para o número animais que executou ejaculação e apresentou intervalo pós-ejaculatório, foi utilizado o teste Qui-quadrado; os valores estão expressos em porcentagem (%) [os números entre parênteses indicam os animais que executaram ejaculação e/ou apresentaram intervalo pós-ejaculatório/número total de animais].\*  $P < 0,02$ .

#### **2.1.4. Concentração plasmática dos hormônios**

##### **2.1.4.1. Prolactina (PRL)**

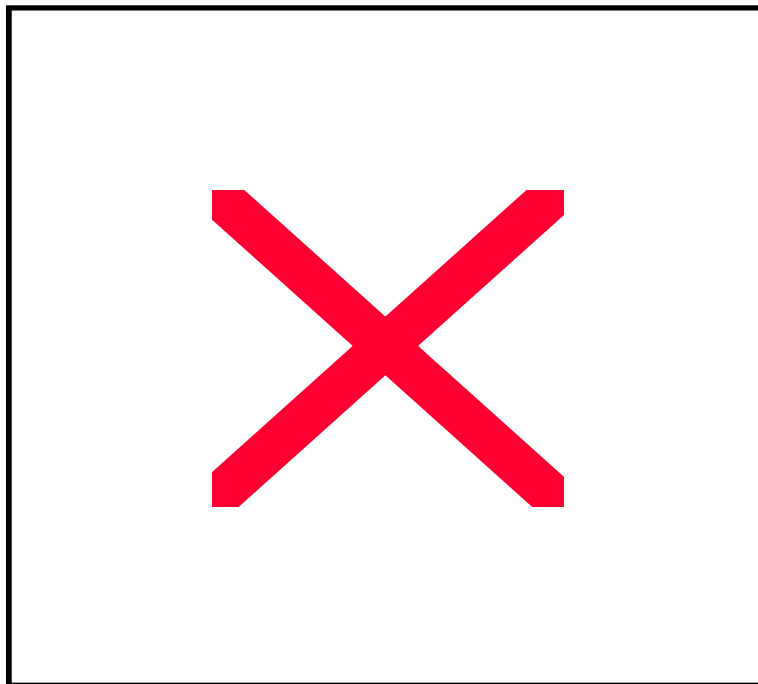
A Figura 7 representa a concentração plasmática de PRL (ng/mL). Houve um aumento significativo de 297% da PRL plasmática no grupo 2R/1C ( $29,0 \pm 3,1$ ) quando comparado ao grupo fictício ( $7,3 \pm 0,8$ ); ( $t = 6,82$ ;  $P < 0,0001$ ).



**Figura 7.** Concentração plasmática de PRL (ng/mL) de ratos machos após vinte e oito dias de cirurgia fictícia (FICT;  $n=23$ ) ou “clipamento” da artéria renal (2R/1C;  $n=23$ ). Os dados foram analisados pelo teste *t-Student*. Os valores da análise estão expressos como média $\pm$ EPM. \* $P<0,0001$ .

#### **2.1.4.2. Hormônio luteinizante (LH)**

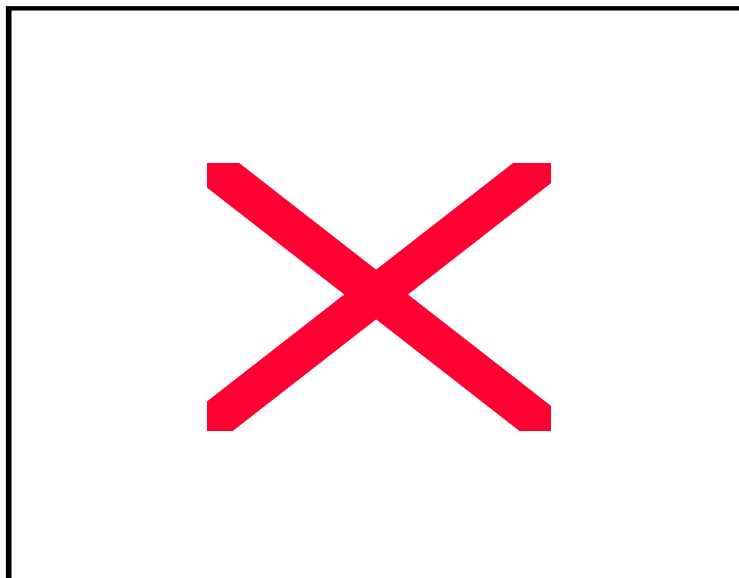
A Figura 8 representa a concentração plasmática de LH (ng/mL). Não houve diferença significativa do LH plasmático no grupo 2R/1C ( $0,45\pm 0,10$ ) quando comparado ao grupo fictício ( $0,57\pm 0,12$ ).



**Figura 8.** Concentração plasmática de LH (ng/mL) de ratos machos após vinte e oito dias de cirurgia fictícia (FICT;  $n=23$ ) ou “clipamento” da artéria renal (2R/1C;  $n=23$ ). Os dados foram analisados pelo teste *t-Student*. Os valores da análise estão expressos como média $\pm$ EPM.

#### **2.1.4.3. Hormônio folículo estimulante (FSH)**

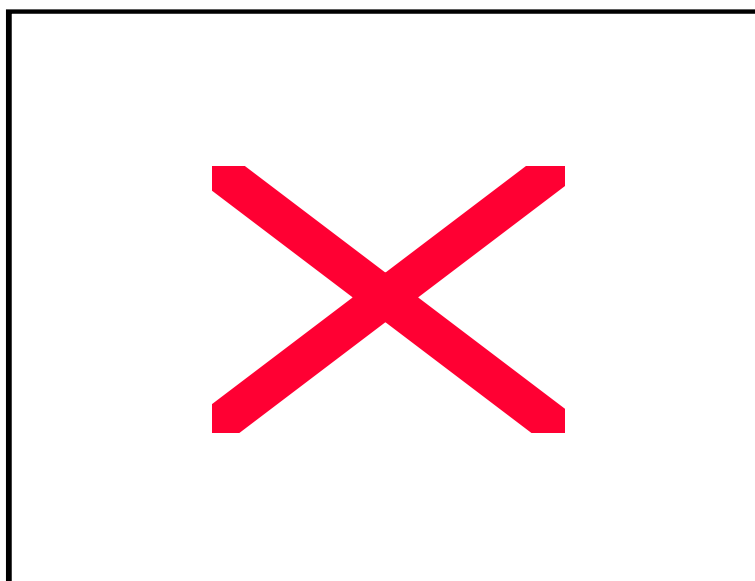
A Figura 9 representa a concentração plasmática de FSH (ng/mL). Não houve diferença significativa do FSH plasmático no grupo 2R/1C ( $7,7\pm 0,7$ ) quando comparado ao grupo fictício ( $8,9\pm 1,0$ ).



**Figura 9.** Concentração plasmática de FSH (ng/mL) de ratos machos após vinte e oito dias de cirurgia fictícia (FICT;  $n=23$ ) ou “clipamento” da artéria renal (2R/1C;  $n=23$ ). Os dados foram analisados pelo teste *t-Student*. Os valores da análise estão expressos como média $\pm$ EPM.

#### **2.1.4.4. Testosterona**

A Figura 10 representa a concentração plasmática de testosterona (ng/mL). Houve uma redução significativa de 50% da testosterona plasmática no grupo 2R/1C ( $0,17\pm 0,03$ ) quando comparado ao grupo fictício ( $0,34\pm 0,06$ ); ( $t= 2,28$ ;  $P<0,03$ ).

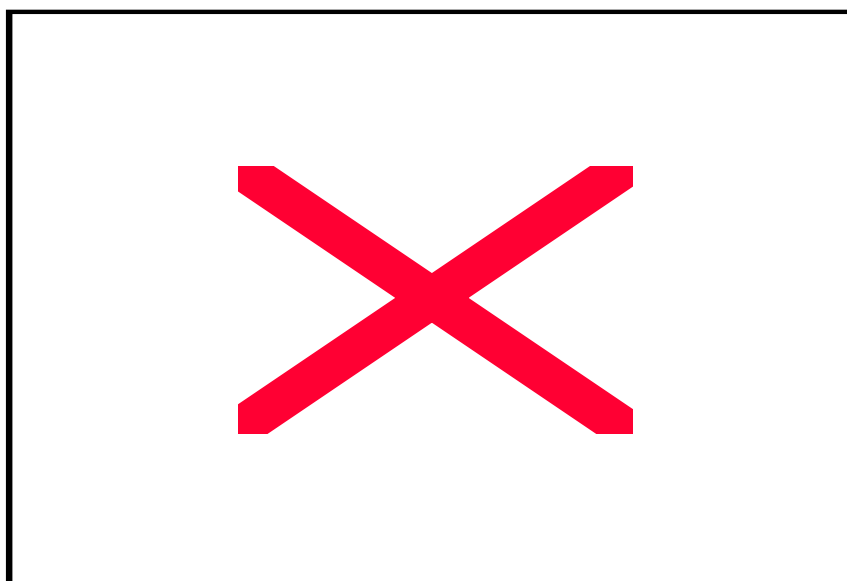


**Figura 10.** Concentração plasmática de testosterona (ng/mL) de ratos machos após vinte e oito dias de cirurgia fictícia (FICT;  $n=23$ ) ou “clipamento” da artéria renal (2R/1C;  $n=23$ ). Os dados foram analisados pelo teste *t-Student*. Os valores da análise estão expressos como média $\pm$ EPM. \* $P<0,03$ .

## 2.1.5. Espermatogênese

### 2.1.5.1. Quociente de espermátides

A Figura 11 representa o quociente de espermátides ( $n^{\circ}\times 10^6$ ). Houve uma redução significativa de 17,5% do quociente de espermátides no grupo 2R/1C ( $177,5\pm 6,8$ ) quando comparado ao grupo fictício ( $215,1\pm 7,5$ ); ( $t= 3,71$ ;  $P<0,002$ ).

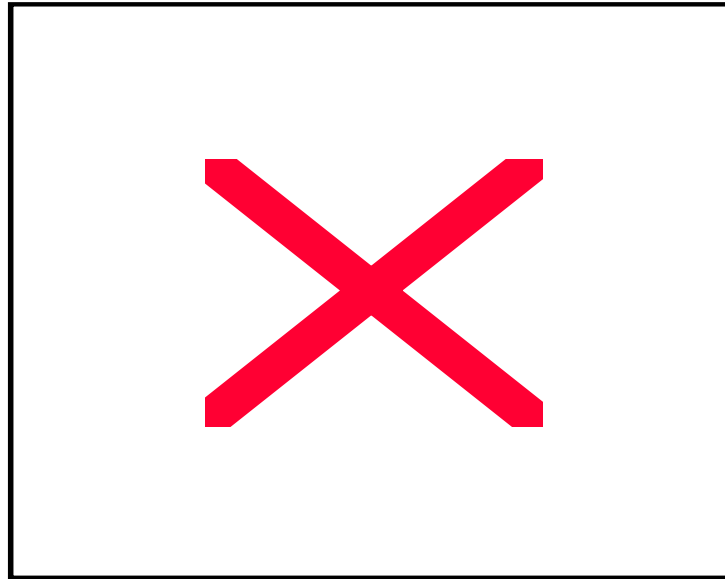


**Figura 11.** Quociente de espermátides (número de espermátides / testículo –  $n^{\circ} \times 10^6$ ) de ratos machos após vinte e oito dias de cirurgia fictícia (FICT;  $n=11$ ) ou “clipamento” da artéria renal (2R/1C;  $n=11$ ). Os dados foram analisados pelo teste *t-Student*. Os valores da análise estão expressos como média $\pm$ EPM.\*  $P<0,002$ .

#### **2.1.5.2. Trânsito epidimário**

A Figura 12 representa o trânsito epidimário ( $n^{\circ}$  de dias). Houve um aumento significativo de 30,4% do trânsito epidimário no grupo 2R/1C ( $10,3\pm 0,6$ ) quando comparado ao grupo fictício ( $7,9\pm 0,4$ ); ( $t= 3,10$ ;  $P<0,006$ ).





**Figura 12.** Trânsito epidimário (nº de dias para a maturação dos espermatozoides) de ratos machos após vinte e oito dias de cirurgia fictícia (FICT;  $n=11$ ) ou “clipamento” da artéria renal (2R/1C;  $n=11$ ). Os dados foram analisados pelo teste *t-Student*. Os valores da análise estão expressos como média±EPM. \*  $P<0,006$ .

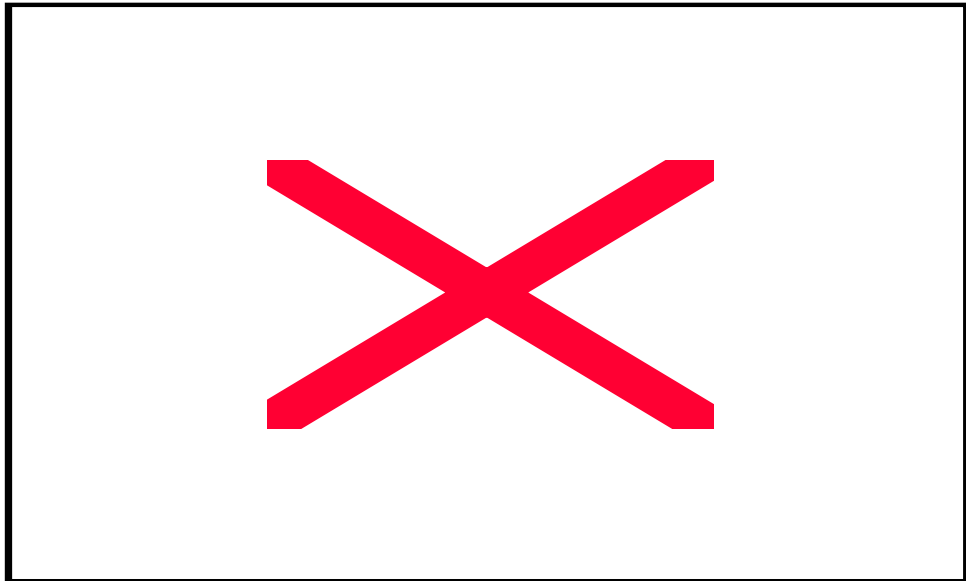
## **2.2. Experimento II - Avaliação da função reprodutiva de ratos machos submetidos à cirurgia fictícia ou ao modelo 2R/1C e tratados com o bloqueador de canais de cálcio nifedipina.**

### **2.2.1. Pressão arterial média (PAM)**

A Figura 13 representa a PAM (mmHg). Foi verificado efeito significativo para a presença do clipe [ $F(1,49)= 43,54; P<0,0001$ ], para o uso da nifedipina [ $F(1,49)= 20,51; P<0,0001$ ] e para a interação entre a presença do clipe e o uso da nifedipina [ $F(1,49)= 33,08; P<0,0001$ ].

A média±EPM dos efeitos principais (presença do clipe e uso da nifedipina) mostrou que a PAM foi maior nos animais “clipados” na artéria renal ( $106,8\pm 3,6$ ) quando comparados aos animais com cirurgia fictícia ( $88,0\pm 2,0$ ), e nos animais em uso de veículo ( $107,8\pm 4,2$ ) em relação aos animais tratados com nifedipina ( $91,0\pm 2,3$ ).

O teste de *Newman-Keuls* mostrou um aumento significativo da PAM do grupo 2R/1C+V ( $123,4\pm 2,6$ ) em relação aos grupos FICT+V ( $85,9\pm 2,0$ ), FICT+N ( $89,6\pm 3,3$ ) e 2R/1C+N ( $92,2\pm 3,3$ ), para  $P<0,0002$ ; os grupos 2R/1C+N, FICT+N e FIVT+V não diferiram significativamente quando comparados entre si.



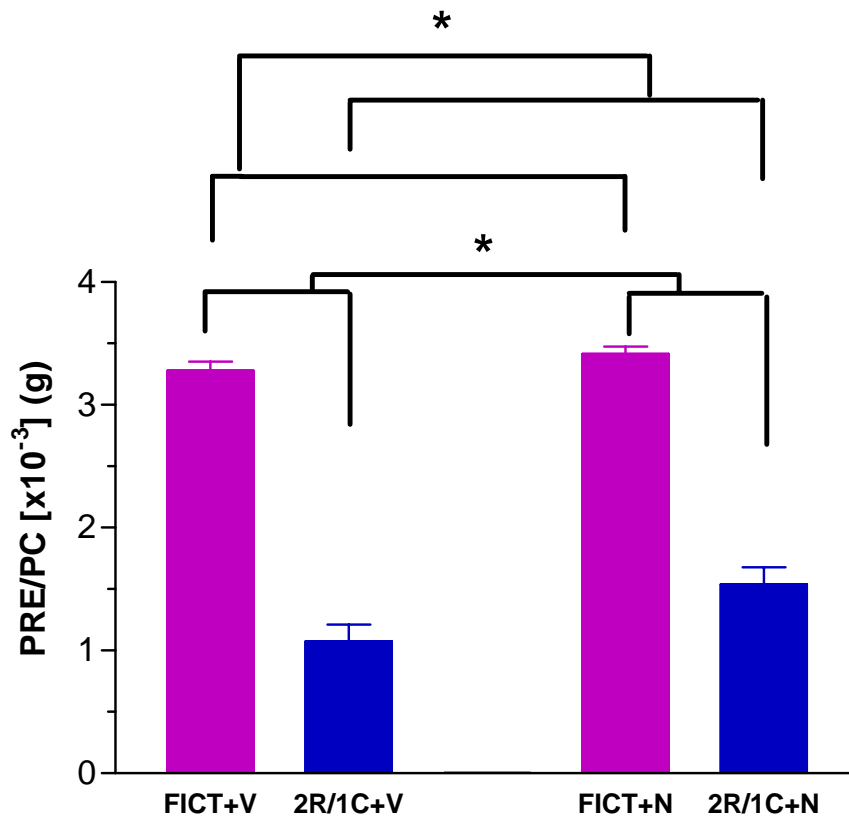
**Figura 13.** PAM (mmHg) de ratos machos após vinte e oito dias da cirurgia fictícia e em uso de veículo (FICT+V;  $n=10$ ) ou tratados com nifedipina (FICT+N;  $n=13$ ), e do “clipamento” da artéria renal, em uso de veículo (2R/1C+V;  $n=14$ ) ou tratados com nifedipina (2R/1C+NIF;  $n=16$ ). Os valores correspondem à média das PAMs detectadas nos trinta segundos subseqüentes a contar do 15º minuto do registro. Para a aquisição dos dados foi utilizado o sistema Acknowledge/BIOPAC. A ANOVA de duas vias foi utilizada na comparação entre os efeitos principais: presença do clipe e uso da nifedipina. O teste de comparações múltiplas *Newman-Keuls* foi utilizado na comparação entre os grupos. Os valores da análise estão expressos como média±EPM. Letras diferentes significam diferença estatística entre grupos ( $P<0,0002$ ).

## **2.2.2. Peso renal/Peso corporal**

### **2.2.2.1. Peso renal esquerdo/Peso corporal**

A Figura 14 representa o peso renal esquerdo/peso corporal [PRE/PC ( $\times 10^{-3}$ g)]. Não foi observado efeito significativo para a interação entre a presença do clipe e o uso da nifedipina [ $F(1,30)=2,71$ ;  $P=0,110$ ]; entretanto, foi detectado efeito significativo para a presença do clipe [ $F(1,30)= 62,18$ ;  $P<0,0001$ ] e para o uso da nifedipina [ $F(1,30)= 5,13$ ;  $P=0,031$ ].

A média $\pm$ EPM dos efeitos principais (presença do clipe e uso da nifedipina) mostrou que o peso renal esquerdo/peso corporal foi menor nos animais “clipados” na artéria renal ( $1,66\pm 0,20$ ) quando comparados aos animais com cirurgia fictícia ( $3,34\pm 0,05$ ), e nos animais em uso de veículo ( $2,11\pm 0,30$ ) em relação aos animais tratados com nifedipina ( $2,58\pm 0,23$ ): houve redução significativa do PRE/PC nos grupos 2R/1C+V ( $1,08\pm 0,14$ ) e 2R/1C+N ( $1,54\pm 0,14$ ) quando comparados aos grupos FICT+V ( $3,28\pm 0,07$ ) e FICT+N ( $3,41\pm 0,06$ ), e dos grupos FICT+V e 2R/1C+V em relação aos grupos FICT+N e 2R/1C+N.

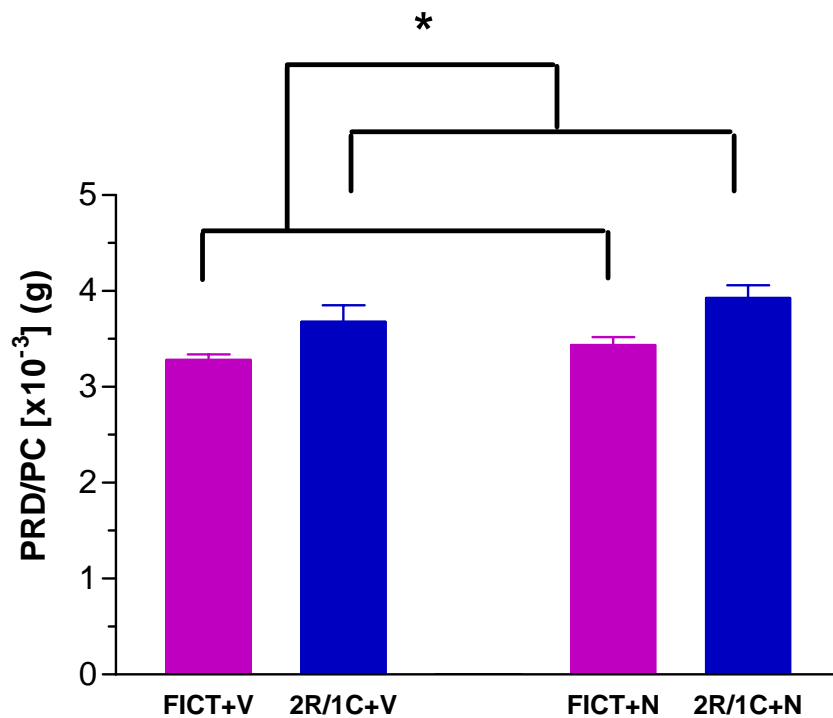


**Figura 14.** Peso renal esquerdo/peso corporal [PRE/PC ( $\times 10^{-3}$ g)] de ratos machos após vinte e oito dias da cirurgia fictícia e em uso de veículo (FICT+V;  $n=7$ ) ou tratados com nifedipina (FICT+N;  $n=7$ ), e do “clipamento” da artéria renal e em uso de veículo (2R/1C+V;  $n=9$ ) ou tratados com nifedipina (2R/1C+N;  $n=11$ ). Os valores obtidos referem-se à razão entre o peso renal esquerdo e o peso corporal. A ANOVA de duas vias foi utilizada na comparação entre os efeitos principais: presença do clipe e uso da nifedipina. Os valores da análise estão expressos como média $\pm$ EPM. (\*) significa diferença estatística entre grupos.  $P<0,05$ .

### 2.2.2.2. Peso renal direito/Peso corporal

A Figura 15 representa o peso renal direito/peso corporal [PRD/PC ( $\times 10^{-3}$ g)]. Não foi observado efeito significativo para o uso da nifedipina [ $F(1,30)= 2,22$ ;  $P=0,147$ ] e para a interação entre a presença do clipe e o uso da nifedipina [ $F(1,30)=0,13$ ;  $P=0,721$ ]; entretanto, foi detectado efeito significativo para a presença do clipe [ $F(1,30)= 10,76$ ;  $P=0,003$ ].

A média $\pm$ EPM do efeito da presença do clipe mostrou que o peso renal direito/peso corporal foi maior nos animais “clipados” na artéria renal ( $3,81\pm 0,11$ ) quando comparados aos animais com cirurgia fictícia ( $3,36\pm 0,05$ ): houve aumento significativo do PRD/PC nos grupos 2R/1C+N ( $3,93\pm 0,13$ ) e 2R/1C+V ( $3,68\pm 0,17$ ) em relação aos grupos FICT+N ( $3,43\pm 0,09$ ) e FICT+V ( $3,28\pm 0,05$ ).



**Figura 15.** Peso renal direito/peso corporal [PRD/PC ( $\times 10^{-3}$ g)] de ratos machos após vinte e oito dias da cirurgia fictícia e em uso de veículo (FICT+V;  $n=7$ ) ou tratados com nifedipina (FICT+N;  $n=7$ ), e do “clipamento” da artéria renal e em uso de veículo (2R/1C+V;  $n=9$ ) ou tratados com nifedipina (2R/1C+N;  $n=11$ ). Os valores obtidos referem-se à razão entre o peso renal direito e o peso corporal. A ANOVA de duas vias foi utilizada na comparação entre os efeitos principais: presença do clipe e uso da nifedipina. Os valores da análise estão expressos como média $\pm$ EPM. (\*) significa diferença estatística entre grupos.  $P<0,05$ .

### 2.2.3. Comportamento Sexual

A Tabela 2 mostra a frequência de monta com intromissão ( $n^{\circ}/10\text{min}$ ), latência de monta com intromissão (s), latência de ejaculação (s) e intervalo pós-ejaculatório (s), como também, o número de animais que executaram ejaculação e apresentaram intervalo pós-ejaculatório (%) dos grupos: FICT+V, 2R/1C+V, FICT+N e 2R/1C+N.

Considerando a frequência de monta com intromissão, foi observado efeito significativo para o uso da nifedipina [ $F(1,49)=4,94$ ;  $P=0,031$ ], para a presença do clipe [ $F(1,49)=8,98$ ;  $P<0,04$ ] e para a interação entre a presença do clipe e o uso da nifedipina [ $F(1,49)=6,58$ ;  $P<0,02$ ]. A média $\pm$ EPM dos efeitos principais (presença do clipe e uso da nifedipina) mostrou que a frequência de monta com intromissão foi menor nos animais “clipados” na artéria renal ( $7,3\pm 1,0$ ) quando comparados aos animais com cirurgia fictícia ( $9,4\pm 0,4$ ), e nos animais em uso de veículo ( $6,8\pm 0,8$ ) em relação aos animais tratados com nifedipina ( $9,3\pm 0,8$ ). O teste de *Newman-Keuls* mostrou uma redução significativa na

freqüência de monta do grupo 2R/1C+V ( $4,7 \pm 0,9$ ) em relação aos grupos FICT+V ( $9,8 \pm 0,8$ ;  $P < 0,02$ ), FICT+N ( $9,1 \pm 0,6$ ;  $P < 0,006$ ) e 2R/1C+N ( $9,5 \pm 1,4$ ;  $P < 0,005$ ); os grupos 2R/1C+N, FICT+N e FICT+V não diferiram significativamente quando comparados entre si.

Quanto à latência de monta com intromissão, foi detectado efeito significativo para a presença do clipe [H (1,51) = 16,69;  $P < 0,0001$ ] e para o uso da nifedipina [H (1,51) = 6,58;  $P < 0,02$ ]. O teste de *Dunn* mostrou um aumento significativo na latência de monta do grupo 2R/1C+V [100,5(48,0/518,0)] em relação aos grupos FICT+V [22,0(10,5/46,5);  $P < 0,05$ ] e FICT+N [14,0(11,0/19,5);  $P < 0,001$ ]; o grupo 2R/1C+N [28,5(21,0/76,5)] não apresentou diferença significativa quando comparado aos demais, e os grupos FICT+N e FICT+V não diferiram significativamente quando comparados entre si.

Para a latência de ejaculação foi detectado efeito significativo para a presença do clipe [H (1,51) = 7,49;  $P < 0,007$ ] e para o uso da nifedipina [H (1,51) = 9,07;  $P < 0,003$ ]. O teste de *Dunn* mostrou um aumento significativo da latência de ejaculação do grupo 2R/1C+V [1393,5(716,5/1800,0)] em relação aos grupos 2R/1C+N [479,5 (321,5/763,0);  $P < 0,05$ ] e FICT+N [360,0 (218,0/588,5);  $P < 0,001$ ]; o grupo FICT+V [523,5(330,5/923,0)] não apresentou diferença significativa quando comparado aos demais; os grupos 2R/1C+N e FICT+N não diferiram significativamente quando comparados entre si.

Quanto ao número de animais que ejacularam (%), o teste Qui-quadrado não mostrou efeito significativo para a presença do clipe [FICT+V e 2R/1C+V;  $\chi^2 = 3,43$ ;  $P = 0,064$ ], entretanto, detectou efeito significativo para o uso da nifedipina [2R/1C+V e



2R/1C+N;  $\chi^2= 5,27$ ;  $P<0,03$ ] — houve uma redução significativa de 29% no grupo 2R/1C+V em relação aos demais grupos, independente do efeito da presença do clipe.

Considerando o intervalo pós-ejaculatório, foi verificado efeito significativo para a presença do clipe [ $F(1,45)= 13,43$ ;  $P=0,001$ ], para o uso da nifedipina [ $F(1,45)= 10,68$ ;  $P=0,002$ ] e para a interação entre a presença do clipe e o uso da nifedipina [ $F(1,45)= 6,73$ ;  $P=0,013$ ]. A média $\pm$ EPM dos efeitos principais (presença do clipe e uso da nifedipina) mostrou que o aumento do intervalo pós-ejaculatório foi maior nos animais “clipados” na artéria renal ( $519,4\pm 93,5$ ) quando comparados aos animais com cirurgia fictícia ( $302,4\pm 11,1$ ) e nos animais em uso de veículo ( $567,8\pm 119,8$ ) em relação aos animais tratados com nifedipina ( $313,9\pm 11,2$ ). O teste de *Newman-Keuls* mostrou um aumento do intervalo pós-ejaculatório do grupo 2R/1C+V ( $818,6\pm 215,0$ ) quando comparado aos grupos FICT+V ( $317,0\pm 19,8$ ;  $P<0,003$ ), FICT+N ( $291,2\pm 11,2$ ;  $P<0,002$ ) e 2R/1C+N ( $332,4\pm 17,0$ ;  $P<0,0005$ ); os grupos 2K/1C+N, FICT+N e FICT+V não diferiram significativamente quando comparados entre si

Quanto ao número de animais que apresentaram intervalo pós-ejaculatório (%), o teste Qui-quadrado não mostrou efeito significativo para a presença do clipe [FICT+V e 2R/1C+V;  $\chi^2=3,53$ ;  $P=0,06$ ], entretanto, detectou efeito significativo para o uso da nifedipina [2R/1C+V e 2R/1C+N;  $\chi^2= 5,43$ ;  $P<0,02$ ] — houve uma redução significativa de 30% no grupo 2R/1C+V em relação aos demais grupos, independente do efeito da presença do clipe.

Comportamento sexual de ratos machos submetidos à cirurgia fictícia e ao modelo 2R/1C, tratados com veículo ou com o bloqueador de canais de cálcio nifedipina.

ITENS COMPORTAMENTAIS	FICT+V	2R/1C+V	FICT+N	2R/1C+N
Frequência de monta com intromissão (nº/10 min)	9,8± 0,8 <sup>a</sup>	4,7± 0,9 <sup>b</sup>	9,1± 0,6 <sup>a</sup>	9,5± 1,4 <sup>a</sup>
Latência de monta com intromissão (s)	22,0 <sup>a</sup> (10,5 / 46,5)	100,5 <sup>b</sup> (48,0 / 518,0)	14,0 <sup>a</sup> (11,0 / 19,5)	28,5 <sup>ab</sup> (21,0 / 76,5)
Latência de ejaculação(s)	523,5 <sup>ab</sup> (330,5/923,0)	1393,5 <sup>b</sup> (716,5/1800,0)	360,0 <sup>a</sup> (218,0/588,5)	479,5 <sup>a</sup> (321,5/763,0)
Animais que ejacularam (%)	100 (10/10)	71 <sup>*</sup> (10/14)	100 (13/13)	100 (16/16)
Intervalo pós-ejaculatório(s)	317,0± 20,9 <sup>a</sup>	818,6± 215,0 <sup>b</sup>	291,2± 11,2 <sup>a</sup>	332,4± 17,0 <sup>a</sup>
Animais que apresentaram período pós-ejaculatório (%)	100 (10/10)	70 <sup>*</sup> (7/10)	100 (13/13)	100 (16/16)

**Tabela 2.** Comportamento sexual de ratos machos após vinte e oito dias da cirurgia fictícia e em uso de veículo (FICT+V;  $n=10$ ) ou tratados com nifedipina (FICT+N;  $n=13$ ), e do “clipamento” da artéria renal e em uso de veículo (2R/1C+V;  $n=14$ ) ou tratados com nifedipina (2R/1C+N;  $n=16$ ). A frequência e a latência da monta com intromissão foram obtidas em sessões de observação de 10min. A latência da ejaculação foi obtida em sessões de observação de 30min após a primeira monta com intromissão. A duração do intervalo pós-ejaculatório foi obtida considerando um novo período de observação de 30min a contar da ejaculação. Para a frequência de monta com intromissão (nº/10min) e

duração do intervalo pós-ejaculatório, foi utilizada a ANOVA de duas vias na comparação entre os efeitos principais: presença do clipe e uso da nifedipina, e o teste de comparações múltiplas *Newman-Keuls* na comparação entre os grupos; os valores estão expressos como média±EPM. Para latência (s) de monta com intromissão e de ejaculação foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo teste de comparações múltiplas de *Dunn*; os valores estão expressos em mediana (intervalo interquartil). Para o número animais que executaram o comportamento de ejaculação ou apresentaram intervalo pós-ejaculatório foi utilizado o teste Qui-quadrado; os valores estão expressos em porcentagem (%) [os números entre parênteses indicam os animais que ejacularam e/ou apresentaram intervalo pós-ejaculatório/número total de animais]. Letras diferentes significam diferença estatística entre grupos e (\*) diferença estatisticamente significativa para o efeito do uso da nifedipina ( $P<0,05$ ).

#### **2.2.4. Concentração plasmática dos hormônios**

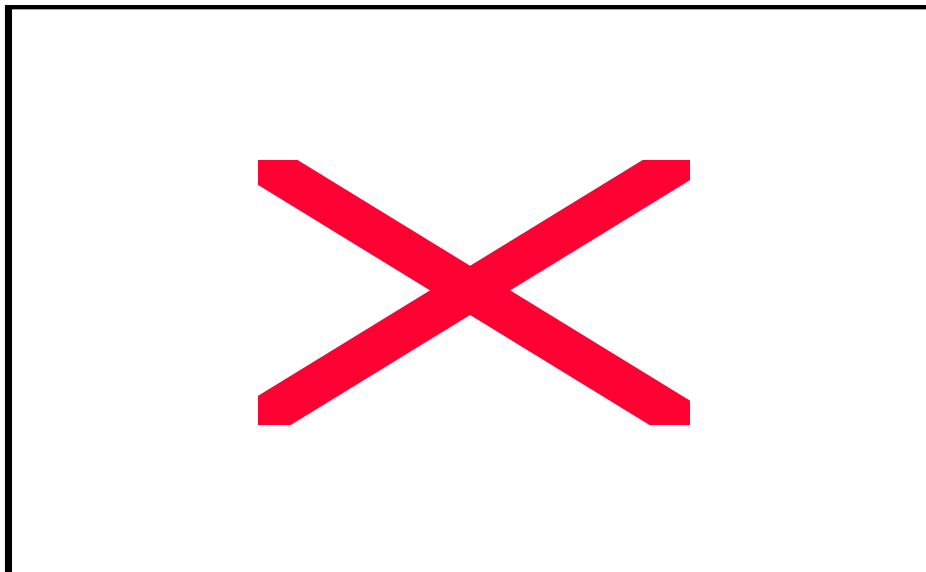
##### **2.2.4.1. Prolactina (PRL)**

A Figura 16 representa a concentração plasmática de PRL (ng/mL). Foi verificado efeito significativo para a presença do clipe [ $F(1,49)=6,51$ ;  $P=0,014$ ], para o uso da nifedipina [ $F(1,49)= 4,40$ ;  $P=0,041$ ] e para a interação entre o efeito da presença do clipe e o uso da nifedipina [ $F(1,49)=7,71$ ;  $P=0,008$ ].

A média±EPM dos efeitos principais (presença do clipe e uso da nifedipina) mostrou que a concentração plasmática de PRL foi maior nos animais “clipados” na

artéria renal ( $8,7\pm 1,2$ ) quando comparados aos animais com cirurgia fictícia ( $5,6\pm 0,7$ ), e nos animais em uso de veículo ( $9,1\pm 1,4$ ) em relação aos animais tratados com nifedipina ( $6,0\pm 0,7$ ).

O teste de *Newman-Keuls* mostrou um aumento significativo da PRL plasmática do grupo 2R/1C+V ( $12,2\pm 1,9$ ) quando comparado aos grupos FICT+V ( $4,8\pm 0,6$ ;  $P<0,004$ ); FICT+N ( $6,3\pm 1,3$ ;  $P<0,003$ ) e 2R/1C+N ( $5,7\pm 0,9$ ;  $P<0,002$ ); os grupos 2R/1C+N, FICT+N e FICT+V não diferiram significativamente quando comparados entre si.

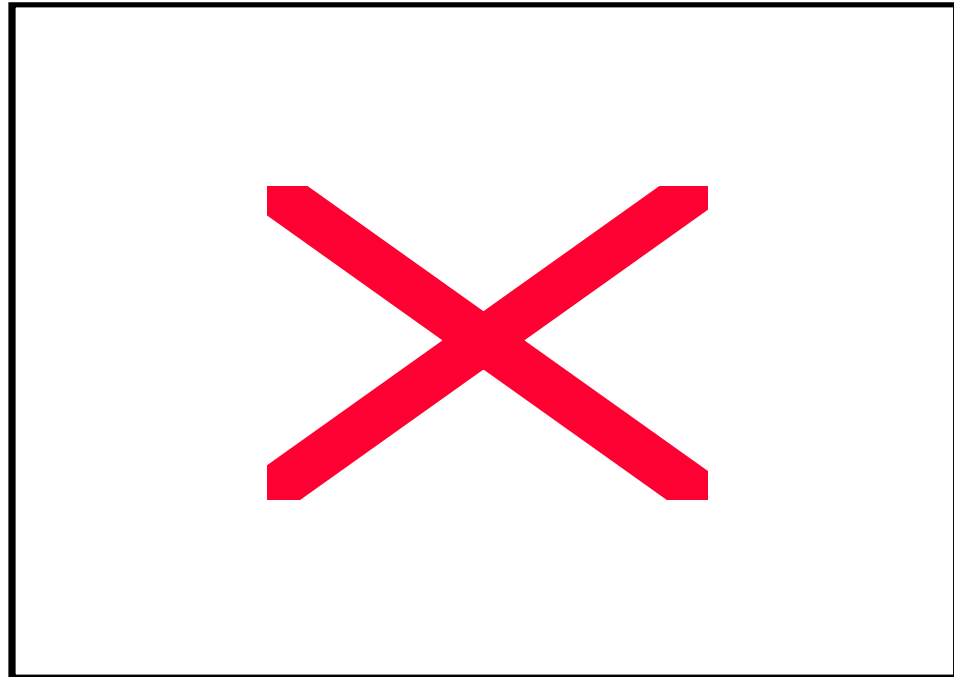


**Figura 16.** Concentração plasmática de PRL (ng/mL) de ratos machos após vinte e oito dias da cirurgia fictícia e em uso de veículo (FICT+V;  $n=10$ ) ou tratados com nifedipina (FICT+N;  $n=13$ ), e do “clipamento” da artéria renal e em uso de veículo (2R/1C+V;  $n=14$ ) ou tratados com nifedipina (2R/1C+N;  $n=16$ ). Foi utilizada a ANOVA de duas vias na comparação entre os efeitos principais: presença do clipe e uso da nifedipina. O teste de

comparações múltiplas *Newman-Keuls* foi utilizado na comparação entre os grupos. Os valores da análise estão expressos como média±EPM. Letras diferentes significam diferença estatística entre grupos.  $P < 0,05$ .

#### **2.2.4.2. Hormônio luteinizante (LH)**

A Figura 17 representa a concentração plasmática de LH (ng/mL). Não foi observado efeito significativo para a presença do clipe [ $F(1,49) = 0,15$ ;  $P = 0,699$ ], do uso da nifedipina [ $F(1,49) = 3,06$ ;  $P = 0,087$ ] e para a interação entre o efeito da presença do clipe e o uso da nifedipina [ $F(1,49) = 0,11$ ;  $P = 0,740$ ] sobre o LH plasmático nos grupos FICT+V (0,31±0,07), 2R/1C+V (0,29±0,06), FICT+N (0,21±0,06) e 2R/1C+N (0,25±0,08).

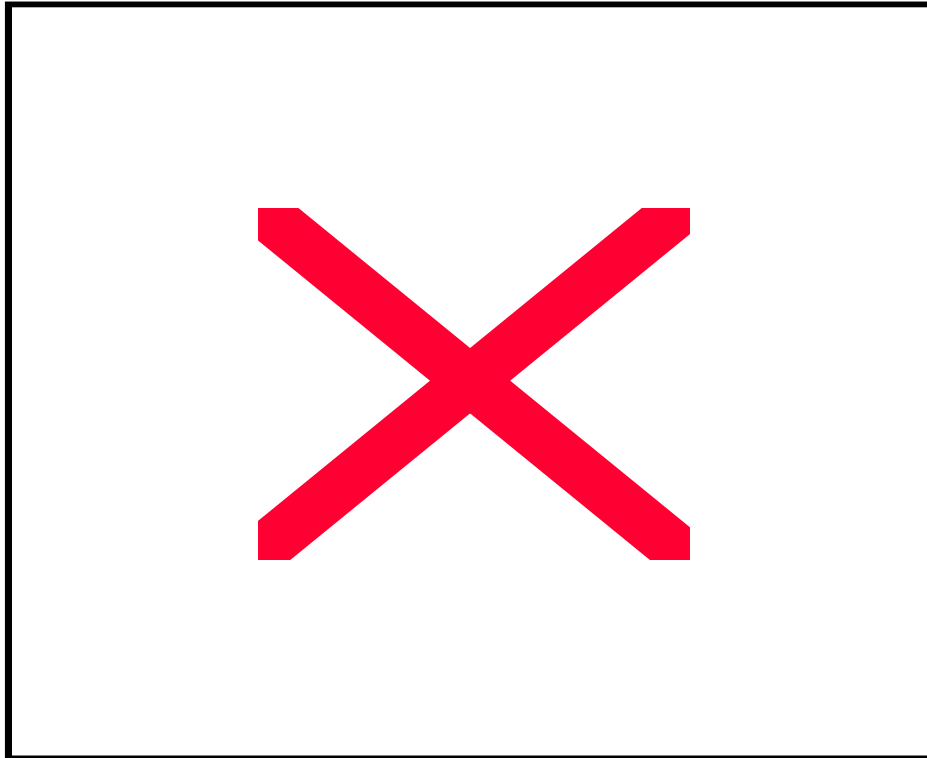


**Figura 17.** Concentração plasmática de LH (ng/mL) de ratos machos após vinte e oito dias da cirurgia fictícia e em uso de veículo (FICT+V;  $n=10$ ) ou tratados com nifedipina (FICT+N;  $n=13$ ), e do “clipamento” da artéria renal e em uso de veículo (2R/1C+V;  $n=14$ ) ou tratados com nifedipina (2R/1C+N;  $n=16$ ). A ANOVA de duas vias foi utilizada na comparação entre os efeitos principais: presença do clipe e uso da nifedipina. Os valores da análise estão expressos como média $\pm$ EPM.

### 2.2.4.3. Hormônio folículo estimulante (FSH)

A Figura 18 representa a concentração plasmática de FSH (ng/mL). Não foi observado efeito significativo do uso da nifedipina [ $F(1,49) = 0,03$ ;  $P = 0,867$ ] e da interação entre a presença do clipe e o uso da nifedipina [ $F(1,49) = 0,36$ ;  $P = 0,549$ ]; entretanto, foi detectado efeito significativo da presença do clipe [ $F(1,49) = 12,31$ ;  $P = 0,001$ ].

A média $\pm$ EPM do efeito da presença do clipe mostrou que o FSH plasmático foi menor nos animais “clipados” na artéria renal ( $8,6\pm 0,8$ ) quando comparados aos animais com cirurgia fictícia ( $12,5\pm 0,8$ ): houve redução significativa nos grupos 2R/1C+V ( $8,7\pm 1,4$ ) e 2R/1C+N ( $8,6\pm 1,0$ ) em relação aos grupos FICT+V ( $13,2\pm 1,3$ ) e FICT+N ( $11,9\pm 1,1$ ).



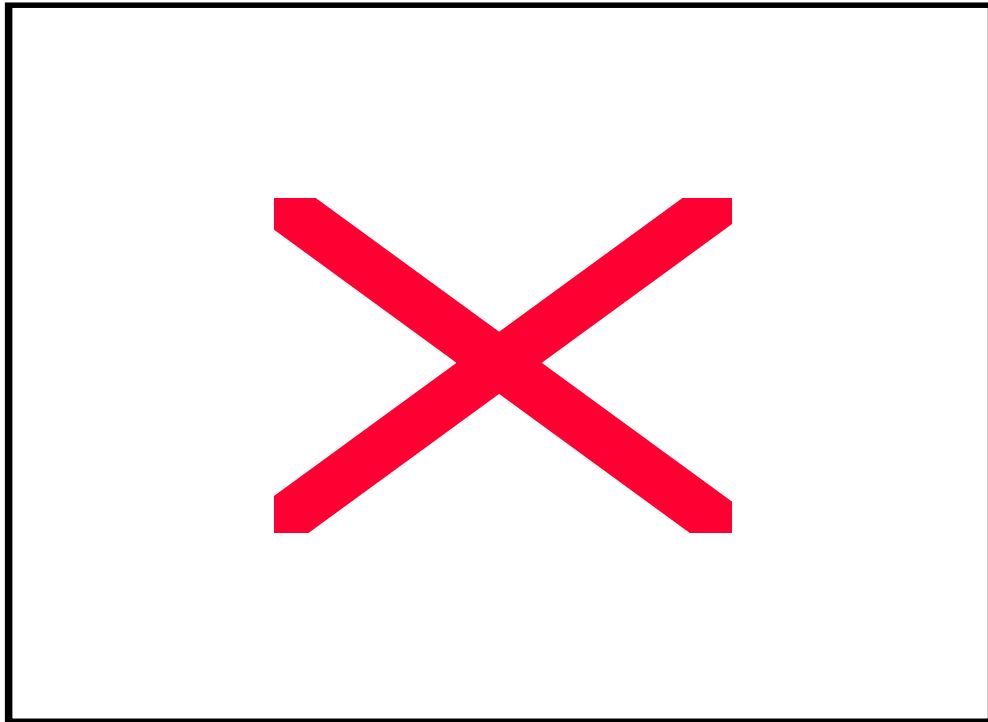
**Figura 18.** Concentração plasmática de FSH (ng/mL) de ratos machos após vinte e oito dias da cirurgia fictícia e em uso de veículo (FICT+V;  $n=10$ ) ou tratados com nifedipina (FICT+N;  $n=13$ ), e do “clipamento” da artéria renal e em uso do veículo (2R/1C+V;  $n=14$ ) ou tratados com nifedipina (2R/1C+N;  $n=16$ ). A ANOVA de duas vias foi utilizada na comparação entre os efeitos principais: presença do clipe e uso da nifedipina. Os valores da análise estão expressos como média $\pm$ EPM. (\*) significa diferença estatística entre grupos.  $P<0,05$ .



#### 2.2.4.4. Testosterona

A Figura 19 representa a concentração plasmática de testosterona (ng/mL). Não foi observado efeito significativo para o uso da nifedipina [ $F(1,38) = 0,27$ ;  $P = 0,609$ ] e para a interação entre a presença do clipe e do uso da nifedipina [ $F(1,38) = 1,64$ ;  $P = 0,209$ ]; entretanto, foi detectado efeito significativo para a presença do clipe [ $F(1,38) = 7,92$ ;  $P = 0,008$ ].

A média $\pm$ EPM do efeito da presença do clipe mostrou que a testosterona plasmática foi menor nos animais “clipados” na artéria renal ( $0,13 \pm 0,04$ ) quando comparados aos animais com cirurgia fictícia ( $0,25 \pm 0,06$ ): houve redução significativa nos grupos 2R/1C+V ( $0,18 \pm 0,08$ ) e 2R/1C+N ( $0,09 \pm 0,03$ ) em relação aos grupos FICT+V ( $0,27 \pm 0,11$ ) e FICT+N ( $0,23 \pm 0,05$ ).



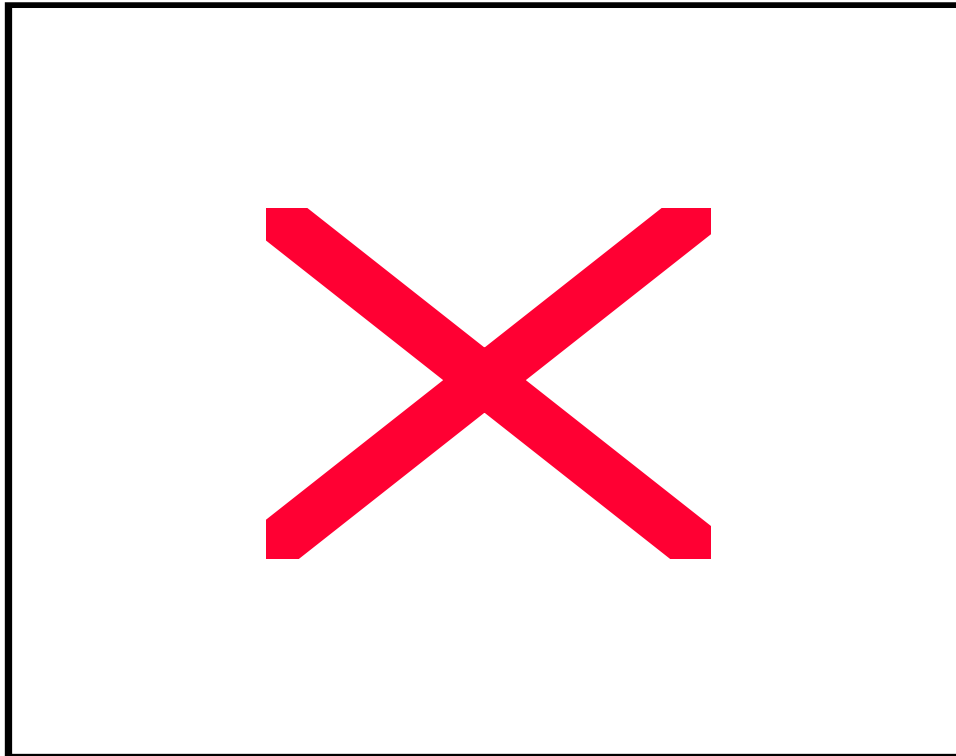
**Figura 19.** Concentração plasmática de testosterona (ng/mL) de ratos machos após vinte e oito dias da cirurgia fictícia e em uso de veículo (FICT+V;  $n=10$ ) ou tratados com nifedipina (FICT+N;  $n=13$ ), e do “clipamento” da artéria renal e em uso de veículo (2R/1C+V;  $n=8$ ) ou tratados com nifedipina (2R/1C+N;  $n=11$ ). A ANOVA de duas vias foi utilizada na comparação entre os efeitos principais: presença do clipe e uso da nifedipina. Os valores da análise estão expressos como média $\pm$ EPM. (\*) significa diferença estatística entre grupos.  $P<0,05$ .

## **2.2.5. Espermatogênese**

### **2.2.5.1. Quociente de espermátides**

A Figura 20 representa o quociente de espermátides ( $n^{\circ} \times 10^6$ ). Não foi observado efeito significativo para o uso da nifedipina [ $F(1,32) = 0,70$ ;  $P=0,409$ ] e para a interação entre a presença do clipe e o uso da nifedipina [ $F(1,32) = 0,18$ ;  $P=0,672$ ]; entretanto, foi detectado efeito significativo para a presença do clipe [ $F(1,32)= 13,25$ ;  $P=0,001$ ].

A média $\pm$ EPM do efeito da presença do clipe mostrou que o quociente de espermátides foi menor nos animais “clipados” na artéria renal ( $165,4\pm 9,2$ ) quando comparados aos animais com cirurgia fictícia ( $213,9\pm 9,0$ ): houve uma redução significativa nos grupos 2R/1C+V ( $168,5\pm 16,0$ ) e 2R/1C+N ( $163,1\pm 11,4$ ) em relação aos grupos FICT+V ( $222,3\pm 12,1$ ) e FICT+N ( $205,6\pm 13,4$ ).

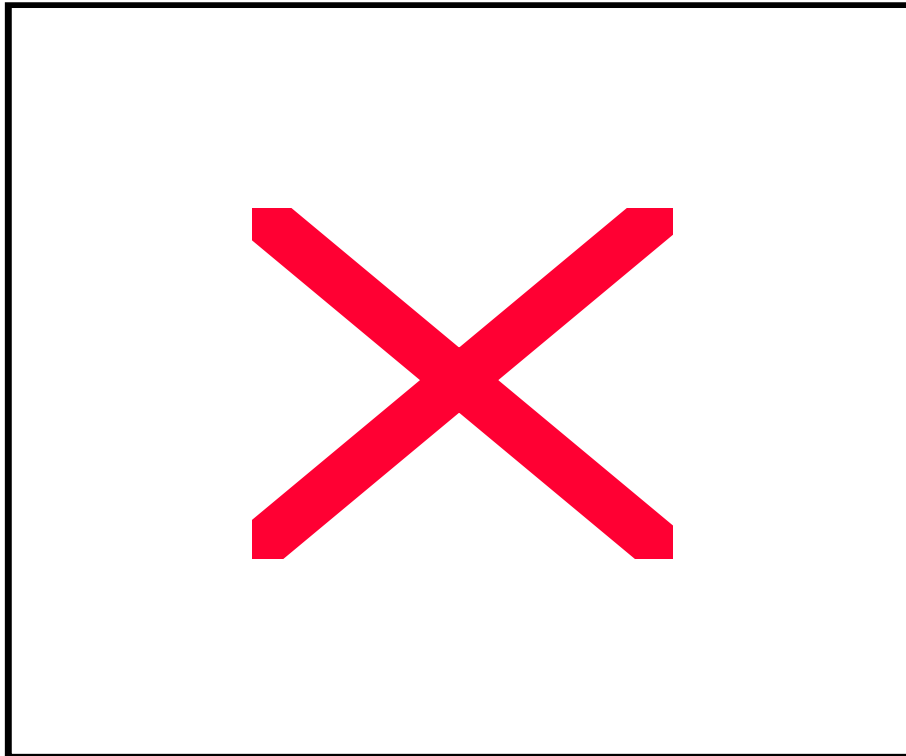


**Figura 20.** Quociente de espermátides (número de espermátides/testículo –  $n^{\circ} \times 10^6$ ) de ratos machos após vinte e oito dias da cirurgia fictícia e em uso de veículo (FICT+V;  $n=10$ ) ou tratados com nifedipina (FICT+N;  $n=10$ ), e do “clipamento” da artéria renal e em uso de veículo (2R/1C+V;  $n=7$ ) ou tratados com nifedipina (2R/1C+N;  $n=9$ ). A ANOVA de duas vias foi utilizada na comparação entre os efeitos principais: presença do clipe e uso da nifedipina. Os valores da análise estão expressos como média $\pm$ EPM. (\*) significa diferença estatística entre grupos.  $P < 0,05$ .

### 2.2.5.2. Trânsito epididimário

A Figura 21 representa o trânsito epididimário (nº de dias). Não foi observado efeito significativo para o uso da nifedipina [ $F(1,32) = 0,427$ ;  $P=0,518$ ] e para a interação entre a presença do clipe e o uso da nifedipina [ $F(1,32) = 0,019$ ;  $P=0,890$ ], entretanto, foi detectado efeito significativo para a presença do clipe [ $F(1,32)= 24,43$ ;  $P<0,0001$ ].

A média±EPM do efeito da presença do clipe mostrou que o trânsito epididimário foi maior nos animais “clipados” na artéria renal ( $11,75\pm0,73$ ) quando comparados aos animais com cirurgia fictícia ( $7,71\pm0,42$ ): houve aumento significativo nos grupos 2R/1C+V ( $12,12\pm1,06$ ) e 2R/1C+N ( $11,46\pm1,05$ ) em relação aos grupos FICT+V ( $7,92\pm0,50$ ) e FICT+N ( $7,49\pm0,67$ ).



**Figura 21.** Trânsito epididimário (nº de dias de maturação dos espermatozóides) de ratos machos após vinte e oito dias da cirurgia fictícia e em uso de veículo (FICT+V;  $n=10$ ) ou tratados com nifedipina (FICT+N;  $n=10$ ), e do “clipamento” da artéria renal e em uso de veículo (2R/1C+V;  $n=7$ ) ou tratados com nifedipina (2R/1C+N;  $n=9$ ). A ANOVA de duas vias foi utilizada na comparação entre os efeitos principais: presença do clipe e uso da nifedipina. Os valores da análise estão expressos como média±EPM. (\*) significa diferença estatística entre grupos.  $P<0,05$ .

***DISCUSSÃO***

---

O presente estudo mostra que o aumento da PAM está associado a um prejuízo da função sexual de ratos machos com hipertensão induzida pelo modelo 2R/1C, confirmando a hipótese do trabalho.

No primeiro experimento, o aumento da PAM foi acompanhado por uma diminuição do comportamento sexual, aumento da PRL plasmática, redução da testosterona plasmática, diminuição do quociente de espermátides e aumento do trânsito epididimário, após 28 dias de “clipamento” da artéria renal (modelo 2R/1C); entretanto, alterações significativas do LH e FSH plasmáticos não foram observadas. Ao final deste primeiro experimento, seguiu-se o estudo com animais 2R/1C, agora em uso de veículo ou tratados com o bloqueador de canais de cálcio nifedipina.

O segundo experimento procurou averiguar se as alterações do comportamento sexual, dos padrões hormonais e da espermatogênese, induzidas pelo “clipamento” da artéria renal no modelo 2R/1C, o qual, sabidamente, eleva a Ang II, permaneceriam nos animais que tivessem sua pressão arterial normalizada devido ao tratamento com nifedipina por um período de vinte e oito dias. Os resultados mostraram que ratos 2R/1C, quando recebem veículo, apresentam alterações no comportamento sexual, nas respostas hormonais e de espermatogênese semelhantes aos animais que foram somente “clipados” na artéria renal. Por outro lado, ratos 2R/1C tratados com nifedipina apresentaram valores de PAM, parâmetros de comportamento sexual e concentrações plasmáticas de PRL e de LH semelhantes aos animais pertencentes ao grupo da cirurgia fictícia, porém, demonstraram redução da testosterona e do FSH plasmáticos, diminuição do quociente de espermátides e aumento do trânsito epididimário, semelhantes aos animais 2R/1C e, portanto, hipertensos, indicando que, sobre estes parâmetros, a redução da pressão arterial não reverteu as alterações produzidas pelo “clipamento” da artéria renal.



Animais com cirurgia fictícia e tratados com nifedipina não apresentaram alterações nos parâmetros de comportamento sexual, hormonais e de espermatogênese quando comparados aos animais com cirurgia fictícia e que fizeram uso de veículo, mostrando que o tratamento com nifedipina não produziu efeito direto sobre tais parâmetros.

O aumento da Ang II, característico do modelo 2R/1C, parece não ser responsável pela redução do comportamento sexual e aumento da PRL plasmática, pois ratos 2R/1C, supostamente com Ang II elevada, e normotensos, devido ao tratamento com nifedipina, mostraram comportamento sexual normal e concentração plasmática de PRL semelhante aos animais do grupo fictício.

Considerando o conjunto de resultados, a discussão foi dividida em itens com se seguem:

### **1. Ratos machos com hipertensão induzida pelo modelo 2R/1C apresentam alteração na relação peso renal/peso corporal.**

Nosso estudo teve como base experimental o modelo de hipertensão renovascular 2R/1C, amplamente utilizado em pesquisas com interesse cardiovascular devido ao aumento da atividade do SRA para o desenvolvimento e a manutenção da doença hipertensiva.

Os resultados mostraram que ratos “clipados” na artéria renal esquerda apresentam menor peso renal esquerdo em relação ao peso corporal quando comparados aos animais

do grupo fictício. Esta diferença evidencia a efetividade do procedimento cirúrgico, o qual foi um dos critérios de permanência dos animais nos diferentes grupos dos experimentos descritos. A diminuição do fluxo sanguíneo local pela presença do clipe leva à hipotrofia do parênquima renal ipsilateral (Ruckiza & Leenen, 1994).

O tratamento com nifedipina aumentou a relação entre o peso renal esquerdo e peso corporal dos animais “clipados” e normotensos quando comparados aos animais hipertensos, porém sem apresentar diferença significativa. Isto mostra que, apesar da presença do clipe, o tratamento com nifedipina foi efetivo em compensar uma redução muito acentuada do peso renal esquerdo em relação à encontrada nos animais hipertensos. Experimentos com coelhos hipertensos pelo modelo 2R/1C demonstraram que o tratamento com nifedipina reduz a resistência vascular e aumenta o fluxo sanguíneo renal em maiores proporções no rim “não clipado” e em menores proporções no rim “clipado”, sendo que a melhora do fluxo sanguíneo renal nos dois rins foi mais efetiva nos animais 2R/1C tratados com nifedipina quando comparados aos não tratados (Yoshida *et al.*, 1990). Em nosso estudo, o efeito vasodilatador da nifedipina pode ter facilitado o fluxo sanguíneo renal melhorando a distribuição sanguínea no rim “clipado”, o que, em retorno, protegendo-o de uma hipotrofia mais acentuada.

Quanto ao rim direito, ratos que receberam o clipe na artéria renal esquerda apresentaram maior peso renal direito em relação ao peso corporal quando comparados aos animais com cirurgia fictícia. Esta hipertrofia compensatória do rim direito ocorreu exclusivamente nos animais “clipados”, independente do tratamento com nifedipina. Dados prévios mostraram que a Ang II está associada à ativação intracelular de rotas de sinalização de crescimento celular e à indução da hiperplasia e hipertrofia em células renais (Ray *et al.*, 1991; Norman, 1991). Considerando que o modelo 2R/1C promove

ativação do SRA, Valentin e colaboradores (1997) demonstraram que ratos uninefrectomizados apresentam aumento da razão entre o peso do rim mantido e o peso corporal, após uma semana do procedimento cirúrgico, sendo que resultados semelhantes foram encontrados quando os animais receberam tratamento oral com captopril, um bloqueador da enzima conversora de angiotensina. Estes resultados apontam para o papel da Ang II na hipertrofia renal compensatória em experimentos com hipertensão renovascular; no entanto, a Ang II não apresenta um papel crucial neste evento, onde outros fatores podem estar sendo ativados para o mecanismo de crescimento celular em células renais.

Animais com cirurgia fictícia não desenvolveram hipertensão e apresentaram aparência normal dos rins esquerdo e direito.

Nossos resultados mostraram que a cirurgia de “clipamento” da artéria renal (modelo 2R/1C) foi efetiva em causar alterações no parênquima renal e, na seqüência, aumento da PAM, fato fundamental para a proposta deste estudo.

## **2. Ratos machos 2R/1C apresentam PAM elevada; entretanto quando tratados com o bloqueador de canais de cálcio nifedipina apresentam PAM normal.**

Nossos resultados mostraram que ratos 2R/1C exibem valores elevados de PAM. Por outro lado, ratos 2R/1C quando tratados com nifedipina, apresentaram valores de PAM semelhantes aos animais com cirurgia fictícia.

Segundo a literatura, o modelo de hipertensão renovascular 2R/1C requer a ativação do SRA central e periférico para o aumento da pressão arterial sistêmica e para a

manutenção da hipertensão (Martinez-Maldonado, 1991; Nishimura *et al.*, 1992; Ruzicka & Leenen, 1994; Kagiya *et al.*, 2001). Entretanto, a contribuição do SRA na hipertensão renovascular varia dependendo do tempo (dias) após a constrição da artéria renal (Nishimura *et al.*, 1992; Kagiya *et al.*, 2001). Neste contexto, alguns trabalhos referem-se a duas fases distintas da hipertensão induzida pelo modelo 2R/1C: a fase aguda e a fase crônica da hipertensão renovascular.

A fase aguda da hipertensão renovascular em ratos (seis dias após o “clipamento” da artéria renal) foi associada com aumento significativo da atividade da renina plasmática e Ang II circulante, e aumento em 30% da expressão de RNAm para angiotensinogênio em tronco encefálico, detectado por autoradiografia (Nishimura *et al.*, 1992). Em coelhos, a fase aguda (cinco dias após o “clipamento” da artéria renal) foi associada ao aumento da sensibilidade do controle baroreflexo da atividade nervosa simpática renal, acompanhado por elevação da pressão arterial e aumento da concentração plasmática de Ang II, de vasopressina e de noradrenalina (Kumagai *et al.*, 1990).

Contrariando os eventos da fase aguda, a fase crônica da hipertensão renovascular em ratos (vinte e quatro dias após o “clipamento” da artéria renal) coincide com uma significativa redução da atividade da renina plasmática, da Ang II e angiotensinogênio circulantes imunoreativos, e aumento em 80% da expressão de RNAm para angiotensinogênio em tronco encefálico, mantendo PAM elevada (Nishimura *et al.*, 1992). Em coelhos, a fase crônica (vinte e um dias após o “clipamento” da artéria renal) foi associada a uma menor sensibilidade do controle baroreflexo da atividade nervosa simpática renal, e concentrações plasmáticas normais de Ang II, vasopressina e noradrenalina (Kumagai *et al.*, 1990).

Importante salientar que o período (dias) considerado para definir a fase aguda e a fase crônica da hipertensão renovascular (2R/1C) varia conforme a severidade do processo hipertensivo. Para Morishita e colaboradores (1991), em ratos, o “clipamento” da artéria renal que resulta em hipertensão severa é acompanhado de concentrações plasmáticas triplicadas de renina e de Ang II no final de quatro semanas e duplicadas no final de dezesseis semanas quando o animal hipertenso é comparado ao controle.

Considerando o efeito hipertensivo da Ang II, dados prévios mostraram que ratos 2R/1C com ausência do gene codificador do receptor  $AT_{1A}$ , desenvolveram menor aumento da PAM quando comparados aos ratos 2R/1C sem alterações genéticas, evidenciando o papel crucial do receptor  $AT_{1A}$  de Ang II no desenvolvimento da hipertensão no modelo 2R/1C. Estes mesmos resultados também revelaram o papel do receptor  $AT_{1B}$  de Ang II como mediador da vasoconstrição, aumentando a PAM, porém com menor magnitude quando comparado ao efeito da ligação da Ang II ao receptor  $AT_{1A}$  (Červenka *et al.*, 2002). Estudos com injeções icv de antisense para RNAm de angiotensinogênio e do receptor  $AT_{1A}$  de Ang II, após seis e dez meses de “clipamento” da artéria renal, respectivamente, mostraram que a inibição do SRA central reduz a pressão arterial e o conteúdo de Ang II hipotalâmica, detectada por radioimunoensaio, apontando para o papel do SRA central na manutenção da pressão arterial na fase crônica da hipertensão renovascular em ratos (Kagiyama *et al.*, 2001).

Portanto, na fase aguda da hipertensão renovascular, o aumento da pressão arterial torna-se dependente do SRA periférico, sendo que na fase crônica da hipertensão renovascular, a manutenção do aumento da pressão arterial torna-se dependente do SRA central (Nishimura *et al.*, 1992; Kagiyama *et al.*, 2001). Então, a Ang II, tanto central quanto periférica, é um fator necessário para desencadeamento dos possíveis mecanismos

que eventualmente levam ao processo hipertensivo de origem renovascular (DeForrest *et al.*, 1982; Martinez-Maldonado, 1991).

Além da Ang II central ou circulante, o aumento da concentração vascular de Ang II também contribui para o desenvolvimento e a manutenção da hipertensão devido à subsequente hipertrofia e proliferação da musculatura lisa dos vasos, tanto na fase aguda quanto crônica da hipertensão renovascular (Morishita *et al.*, 1992). Hipertrofia vascular, induzida pela ação direta ou indireta da Ang II local aumentada, é observada após quatro semanas de “clipamento” da artéria renal; entretanto, a hipertrofia vascular é realçada ao final de dezesseis semanas após o “clipamento” da artéria renal, devido a um aumento crescente da Ang II local (Morishita *et al.*, 1992).

O avanço no desenvolvimento de fármacos com ação antihipertensiva melhorou a qualidade de vida e diminuiu as taxas de morbi-mortalidade de pacientes com alterações cardiovasculares; a nifedipina é um dos fármacos utilizados no tratamento da hipertensão renovascular (Yoshida *et al.*, 1990). O mais conhecido efeito antihipertensivo da nifedipina é o bloqueio do influxo de cálcio para a musculatura lisa dos vasos, com consequente reversão do aumento da resistência vascular periférica ocasionada pela ação da Ang II (Loutzenhiser & Epstein, 1985; Catterall & Striessnig, 1992; Hirasawa & Pittman, 2003). Nifedipina não promove alteração na pressão sangüínea de sujeitos normotensos e impede o aumento da PAM durante o tratamento endovenoso com endotelina-1, um agente hipertensor (Kaasjager, Koomans & Rabelink, 1995). Dados prévios demonstraram que ratos com hipertensão induzida pelo modelo 2R/1C e tratados, posteriormente, com nifedipina apresentam uma redução da resistência vascular e aumento do fluxo sangüíneo renal, como também, realce da filtração glomerular e marcada natriurese pelo rim “não-clipado” (Yoshida *et al.*, 1990; Huang, 1986). Outro efeito

farmacológico da nifedipina é o impedimento da hipertrofia tissular, ação mediada pelo aumento da Ang II na doença hipertensiva. Neste contexto, ratos SHR e tratados oralmente com nifedipina por um período de um mês, apresentaram redução significativa da hipertrofia miocárdica acompanhada por diminuição da pressão arterial, quando comparados aos SHR não tratados (Hurtado *et al.*, 2002).

Considerando que uma maior atividade do SRA acontece no modelo 2R/1C, o seguimento do trabalho foi relacionado com o aumento da pressão arterial devido à Ang II sabidamente elevada.

**3. Ratos machos com hipertensão induzida pelo modelo 2R/1C apresentam diminuição do comportamento sexual; entretanto, ratos 2R/1C, tratados com o bloqueador de canais de cálcio nifedipina, apresentam comportamento sexual normal.**

Nossos resultados mostraram que ratos hipertensos (modelo 2R/1C) exibiram uma redução da frequência de monta com intromissão, maior latência para iniciar a monta com intromissão, longos intervalos entre monta com intromissão e ejaculação e aumento da duração do intervalo pós-ejaculatório, com diminuição do número de animais que ejacularam e que retomaram à atividade sexual após a ejaculação, quando comparados aos animais com cirurgia fictícia. Resultados semelhantes para o aumento da pressão arterial e redução do comportamento sexual foram reproduzidos quando ratos hipertensos fizeram uso de veículo. Entretanto, ratos “clipados” na artéria renal e tratados com nifedipina apresentaram valores normais de PAM coincidentes com um comportamento sexual

normal. Além disto, todos os animais “clipados” na artéria renal e tratados com nifedipina ejacularam e retomaram à atividade sexual pós-ejaculação.

Os resultados mostraram que o aumento da PAM parece ser um fator importante no prejuízo do comportamento sexual de ratos hipertensos (modelo 2R/1C), já que a PAM normal em ratos 2R/1C tratados com nifedipina está relacionada a um padrão normal de comportamento sexual.

Estudos relacionados aos processos reprodutivos reforçam a associação entre a doença hipertensiva e a patogênese da impotência sexual (Feldman *et al.*, 1994; Jensen *et al.*, 1999; Burchardt *et al.*, 2000; Brotos *et al.*, 2004; Karadeniz *et al.*, 2004; Russel, Khandheria & Nehra, 2004; Seftel, Sun & Swindle, 2004; Behr-Roussel *et al.*, 2005), onde mecanismos reguladores centrais e periféricos da pressão arterial sistêmica podem estar relacionados funcionalmente com os sistemas que modulam o comportamento sexual. O SRA é um dos principais mecanismos reguladores da pressão arterial, onde a Ang II apresenta potente função vasoconstritora e de regulação hidreletrolítica (Saavedra, 1992; Sanvitto *et al.*, 1997; Robinson *et al.*, 1999).

Dados da literatura sugerem uma participação da Ang II no processo hipertensivo e nas alterações do comportamento sexual: (a) o bloqueio do receptor  $AT_{1A}$  reduz a pressão arterial sistêmica na fase aguda da hipertensão renovascular (Galli & Phillips, 2001); (b) o receptor  $AT_1$  encontra-se em áreas cruciais para o controle do comportamento sexual como a APOM e a AMe (Tsutsumi & Saavedra, 1991; Halbach & Albrecht, 1998); (c) a infusão icv de Ang II inibe o comportamento sexual de ratos machos (Clark, 1989); (d) a infusão icv de Ang II, aguda ou crônica, inibe o comportamento sexual e aumenta a pressão sistólica de ratos machos (Keaton & Clark, 1998), (e) a Ang II administrada diretamente na AMe inibe o comportamento sexual de ratos machos (Breigeiron *et al.*,



2002); e (f) a Ang II central inibe o comportamento sexual de ratos machos envolvendo o receptor AT<sub>1</sub> (Keaton & Clark, 1998; Breigeiron *et al.*, 2002) e o receptor AT<sub>2</sub> (Breigeiron *et al.*, 2002). Além disso, Becker e colaboradores (2001) demonstraram que a Ang II periférica tem um papel significativo na fisiopatologia da disfunção erétil, uma vez que o aumento da Ang II plasmática pode estar envolvido na iniciação de detumescência peniana em humanos.

Entretanto, para o modelo 2R/1C, nossos resultados mostraram que a Ang II parece não apresentar um efeito decisivo na redução do comportamento sexual, pois ratos 2R/1C e tratados com nifedipina, ou seja, animais normotensos com Ang II supostamente elevada, mostraram um padrão normal de comportamento sexual. Na hipertensão renovascular a redução do comportamento sexual parece ser sensível às variações de pressão arterial e não ao aumento da Ang II, característico do modelo 2R/1C.

Periféricamente, além da Ang II, outros fatores podem estar associados ao comprometimento da resposta erétil a qual leva à disfunção sexual na doença hipertensiva. Dados prévios mostraram que, após a estimulação elétrica do nervo cavernoso do pênis de ratos SHR, há uma redução na frequência-dependente necessária para o aumento da pressão intracavernosa e, portanto, para a resposta erétil (Behr-Roussel *et al.*, 2003). Estes resultados sugerem que a impotência sexual dos ratos SHR pode estar relacionada a uma disfunção dos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos responsáveis pela contração da musculatura lisa dos corpos cavernosos, ou um aumento na reatividade da ciclooxigenase-dependente, ou um defeito na reatividade endotélio-dependente (Behr-Roussel *et al.*, 2003). Portanto, existem semelhanças nas modificações funcionais patológicas entre o sistema arterial e a reatividade tecidual dos corpos cavernosos na doença hipertensiva.

Interessante mostrar que o tratamento com nifedipina impediu o aumento da pressão arterial e proporcionou que ratos 2R/1C exibissem um comportamento sexual normal. Ao contrário do que os dados da literatura sugerem sobre uma relação do tratamento antihipertensivo com a piora da função sexual (Chan *et al.*, 1999), nosso estudo mostrou que a nifedipina não altera os parâmetros normais de comportamento sexual, como visto nos animais com cirurgia fictícia.

Vários fatores apontam para uma possível ação da nifedipina como mediadora da síntese de NO, o que poderia ser a causa da melhora do comportamento sexual: (a) a nifedipina tem a propriedade de cruzar facilmente a barreira hematoencefálica (Janicki *et al.*, 1988); (b) a nifedipina tem ação de secretagogo neuronal aumentando a secreção de transmissores, independente de sua ação sobre canais de cálcio tipo L, como mostrado em estudos *in vitro* (Hirasawa & Pittman, 2003); (c) a nifedipina pode aumentar a secreção de NO por ativação indireta da enzima óxido-nítrico sintase endotelial (Dhein *et al.*, 1999); (e) a nifedipina pode aumentar a secreção de NO por estimular a síntese de fatores de crescimento do endotélio vascular, o que, por sua vez, está envolvida na *up-regulation* da expressão da enzima superóxido dismutase (Fukuo *et al.*, 2002) — dados *in vivo* mostraram que a deficiência da enzima superóxido dismutase resulta na piora da dilatação endotelial através da inativação direta do NO (Lynch, Frei & Morrow, 1997); (d) neurônios oxidonitrérgicos, responsáveis pela produção de NO e suas respectivas proteínas reguladoras, estão presentes e co-localizados em áreas centrais envolvidas na ereção peniana, como o hipotálamo e a medula espinhal (Ferrini *et al.*, 2003); e (f) o NO medeia a neurotransmissão inibitória responsável pela emissão seminal nos ratos tratados com pilocarpina, uma droga colinérgica (Tomé *et al.*, 1999), mostrando o papel do NO na ereção peniana através da formação de GMPc, componente da cascata metabólica que leva

ao relaxamento muscular dos corpos cavernosos (Holmquist, Hedlund & Andersson, 1992; McCann *et al.*, 1999).

O conjunto dos resultados acima citados aponta a nifedipina como sendo uma participante indireta na síntese e secreção de NO, um importante transmissor com ação central e periférica na fisiologia da função reprodutiva.

Nossos dados mostraram que ratos 2R/1C tratados com nifedipina apresentaram PAM e comportamento sexual normais, apesar do provável aumento da Ang II característico deste modelo, o que, de certa forma, mostrou que, nestes desfechos, a Ang II não teria uma participação crucial. Por outro lado, ratos hipertensos apresentaram redução do comportamento sexual. Isto sugere que o comportamento sexual normal de ratos 2R/1C tratados com nifedipina, pode estar relacionado à pressão arterial normal ou à ação direta da nifedipina sobre a produção de NO, o que poderia estar contra-regulando os efeitos da Ang II. Ratos 2R/1C tratados com L-NAME, um inibidor da óxido nítrico sintetase, apresentaram aumento importante da pressão arterial, quando comparados aos ratos 2R/1C não tratados, mostrando a importância do NO em contrabalançar a magnitude da PAM no modelo 2R/1C (Červenka *et al.*, 2002).

Outros dados indicam que, na presença da nifedipina, algumas áreas centrais apresentam uma facilitação na neurotransmissão, sendo este efeito independente da ação da nifedipina sobre os canais de cálcio tipo L ou da produção de NO: em cultura de células, a nifedipina induz a um aumento da frequência e da amplitude de pequenos potenciais pós-sinápticos excitatórios (PPSE) nos núcleos: supra-óptico, paraventricular, supraquiasmático, dorsomotor do vago, e acumbens, devido à ação da nifedipina sobre as terminações nervosas pré-sinápticas excitatórias, induzindo ao aumento da liberação de glutamato (Hirasawa & Pittman, 2003). O efeito da nifedipina em aumentar os PPSE é

exclusivo da nifedipina, pois este efeito não foi reproduzido com o uso de outros bloqueadores de canais de cálcio (Hirasawa & Pittman, 2003). Neste contexto, a nifedipina poderia estar facilitando as sinapses centrais de áreas responsáveis pela reprodução, refletindo na resposta favorável do comportamento sexual em ratos 2R/1C tratados com nifedipina.

Interessante mostrar que o efeito da nifedipina, seja na manutenção da pressão arterial normal ou na promoção do comportamento sexual normal, acontece somente em animais “clipados”, ou seja, na presença da Ang II elevada. Seino e colaboradores (1984) mostraram que, em coelhos, a infusão iv de nifedipina induz à vasodilatação renal em resposta à administração intra-arterial de Ang II.

Visto que a nifedipina não promove efeito direto sobre o comportamento sexual, esta pode estar participando da situação de contra-regulação, com ação que se sobrepõe aos efeitos da Ang II aumentada, no que se refere à pressão arterial e ao comportamento sexual.

Reforçando o papel central do NO sobre o comportamento sexual, dados prévios mostraram que o NO promove a liberação de dopamina na APOM (ver revisão de Hull *et al.*, 1999), como também o NO promove aumento da secreção de LHRH (McCann *et al.*, 1999). Periféricamente, o tratamento de longo prazo com L-NAME diminui a função erétil de ratos machos (Ferraz *et al.*, 2003); em contraste, o co-tratamento com isradipina, outro bloqueador de canal de cálcio, previne o efeito inibitório sobre a função erétil ocasionado pelo tratamento com L-NAME (Ferraz *et al.*, 2003).

Por ter efeito vasodilatador, o NO contrabalança a vasoconstrição renal dependente de Ang II nas fases aguda e crônica da hipertensão de origem renovascular, mantendo,

assim, a perfusão renal (Sigmon & Beierwaltes, 1998; Gouvêa *et al.*, 2003; Červenka *et al.*, 2002).

Em coelhos 2R/1C e tratados com nifedipina, o valor da pressão arterial apresenta-se similar aos animais “não clipado” e tratados com nifedipina, entretanto, em ambos os grupos a atividade da renina plasmática encontra-se aumentada, com maior significância no grupo “clipado” (Yoshida *et al.*, 1990). Estes dados mostraram que a síntese da Ang II plasmática não é reduzida pelo tratamento com nifedipina na fase dependente de renina na hipertensão renovascular 2R/1C. Com base neste resultado, em nosso estudo, o efeito vasodilatador da nifedipina pode ter se sobreposto ao efeito vasoconstritor da Ang II, impedindo o aumento da pressão arterial nos machos 2R/1C e, portanto, impedindo o efeito da hipertensão sobre a inibição do comportamento sexual.

#### **4. Ratos machos com hipertensão induzida pelo modelo 2R/1C apresentam aumento da PRL plasmática; entretanto, ratos 2R/1C tratados com o bloqueador de canais de cálcio nifedipina apresentam concentração plasmática de PRL normal.**

Ratos hipertensos (modelo 2R/1C) apresentaram aumento da concentração plasmática de PRL quando comparados aos animais com cirurgia fictícia. Quando ratos 2R/1C são tratados com nifedipina, estes apresentaram PRL plasmática semelhante à exibida pelos animais com cirurgia fictícia tratados ou não com nifedipina. O efeito da nifedipina em impedir o aumento da concentração plasmática de PRL ocorre exclusivamente nos animais “clipados”.

No presente estudo, a possível elevação da Ang II plasmática, produzida pelo “clipamento” da artéria renal, pode estar atuando como um fator desencadeante da secreção de PRL, com ação direta nos receptores AT<sub>1A</sub> dispostos sobre as células dos lactotrofos da adenohipófise. Neste contexto, dados prévios mostraram que a secreção de PRL pode ser modulada pelo SRA (Enjalbert *et al.*, 1986; Steele & Myers, 1990): estudos *in vitro* demonstraram que a Ang II promove aumento da secreção de PRL em células de lactotrofos (Steele, Negro-Vilar & McCann, 1981; Steele, Brownfield & Ganong, 1982; Aguilera, Hyde & Catt, 1982; Steele & Myers, 1990; Enjalbert *et al.*, 1986), e a Ang II sintetizada na adenohipófise estimula a secreção de PRL em ratos (Steele, Negro-Vilar & McCann, 1981; Aguilera, Hyde & Catt, 1982; Steele & Myers, 1990).

Por outro lado, o tratamento com nifedipina impediu o aumento da concentração plasmática de PRL em ratos 2R/1C. Sendo que a despolarização dos lactotrofos é cálcio-dependente, Lachowicz e colaboradores (1997) demonstraram que a nifedipina inibe o influxo celular de cálcio, através de sua ação bloqueadora dos canais de cálcio tipo L, levando a um prolongado bloqueio na secreção de PRL pelos lactotrofos.

Nossos resultados mostraram que o aumento da PRL plasmática ocorre apenas nos animais hipertensos, sendo que o tratamento com nifedipina, além de impedir o aumento do hormônio, mantém valores normais de pressão arterial em ratos 2R/1C. Estes dados sugerem que a variação da pressão arterial pode ser causa ou consequência das alterações de PRL plasmática, ou ainda, a nifedipina pode estar impedindo o aumento da PRL plasmática e o aumento da PAM, dois efeitos que acontecem na presença da Ang II elevada — a ação da nifedipina sobre a secreção da PRL e PAM pode estar se sobrepondo ao efeito da Ang II em promover o aumento da PRL e da PAM, refletindo valores de PRL plasmática e de pressão arterial normais em ratos 2R/1C.

Peptídeos imunorreativos semelhantes aos peptídeos liberadores de PRL (PrRP) estão distribuídos em sítios do SNC, como na formação reticular e no NTS, sugerindo a ação dos PrRP no controle central da função cardiovascular (Chen *et al.*, 1999) além da conhecida ação dos PrRP sobre a secreção de PRL em lactotrofos. Em ratos conscientes, injeções icv de PrRP (PrRP-20 e PrRP-31) induziram ao aumento da PAM, por dose-dependente, sendo as respostas pressóricas semelhantes às injeções icv de Ang II (Samson, Resch & Murphy, 2000). O aumento da resposta pressórica e da atividade simpática renal foi reproduzido em experimento com ratos anestesiados e microinjetados com PrRP na medula ventro-lateral caudal, região que contém neurônios imunorreativos para PrRP (Horiuchi *et al.*, 2002). Estes dados sugerem que a PRL não é a responsável pelo aumento da PAM, sendo que o aumento da PRL pode ser coincidente com o aumento da PAM, via ação de PrRP em lactotrofos e em sítios responsáveis pela função cardiovascular.

**5. Ratos machos com hipertensão induzida pelo modelo 2R/1C, e que apresentam aumento da PRL plasmática, exibem diminuição do comportamento sexual, enquanto que ratos 2R/1C tratados com o bloqueador de canais de cálcio nifedipina apresentam comportamento sexual e PRL plasmática normais.**

Nossos resultados mostraram um prejuízo do comportamento sexual coincidente com o aumento da PRL plasmática em ratos hipertensos (modelo 2R/1C) quando comparados aos animais com cirurgia fictícia. Quando ratos 2R/1C foram tratados com nifedipina, estes exibiram valores normais de PRL plasmática e de comportamento sexual semelhantes aos valores mostrados por animais com cirurgia fictícia.

A performance sexual de machos de várias espécies é acompanhada por um aumento na concentração plasmática da PRL. Quando ratos machos foram expostos a fêmeas sexualmente receptivas, estes mostraram aumento das concentrações plasmáticas de PRL, sugerindo uma interação entre o hormônio e a motivação sexual (Kamel *et al.*, 1975; Kamel *et al.*, 1977; Neill, 1980; Krüger *et al.*, 2002; Krüger *et al.*, 2003). Em homens, um aumento da PRL plasmática foi encontrado durante a fase masturbatória do comportamento sexual (Robyn, 1971; Exton *et al.*, 2001). Drago & Lissandrello (2000) mostraram que na presença de PRL plasmática, em baixas doses, o comportamento sexual de ratos é mais facilitado do que inibido. Injeções sc e agudas de PRL em baixas doses também estimulam o comportamento copulatório de ratos impotentes sexualmente (Drago & Lissandrello, 2000). Outros dados mostraram que a administração ip com domperidone por cinco dias induz à hiperprolactinemia aguda e um efeito positivo sobre o comportamento sexual de ratos machos (Nasello *et al.*, 1997). Neste contexto, logo após o início de uma moderada hiperprolactinemia, a frequência de monta, de intromissão e de ejaculação foi aumentada em ratos normais (Drago e Lissandrello, 2000). Os efeitos positivos da PRL sobre o comportamento sexual podem ser devido à indução da secreção de dopamina via um mecanismo de retroalimentação negativa.

Ratos machos, quando expostos a fêmeas receptivas sexualmente, apresentam aumento da secreção de dopamina em três áreas distintas do encéfalo: no sistema nigrostriatal, responsável pela atividade somatomotora; no sistema mesolímbico, que promove a motivação sexual; e na APOM que aumenta a eficácia copulatória e coordena os reflexos genitais (ver revisão de Hull *et al.*, 1999).

O núcleo acumbens representa a maior área do sistema mesolímbico (ver revisão de Hull *et al.*, 1999). Experimentos com microdiálise mostraram que o aumento da



secreção de dopamina no núcleo acumbens favorece a iniciação e a reiniciação do comportamento sexual de ratos machos perante fêmeas receptivas sexualmente (Fiorino, Coury & Phillips, 1997). Para Fuxe e colaboradores (1977), o aumento da reciclagem de dopamina no núcleo acumbens de ratos acontece na presença de PRL. Dados prévios demonstraram que o neurotransmissor dopamina é liberado no núcleo acumbens (Damsma *et al.*, 1992) e no núcleo paraventricular (Melis *et al.*, 2003) antes da cópula, e na porção dorsal do núcleo estriado durante a cópula em ratos machos (Damsma *et al.*, 1992).

A estimulação dos receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> na APOM, por concentrações graduais de dopamina ou agonista dopaminérgico, tem importância crítica no comportamento sexual de várias espécies (Hull *et al.*, 1992; Melis & Argiolas, 1995): o agonista dopaminérgico apomorfina, microinjetado na APOM, em baixas doses, facilita a ereção peniana via estimulação do receptor D<sub>1</sub>, enquanto que, em altas doses, facilita a emissão seminal por ativação do receptor D<sub>2</sub>, em ratos (Hull *et al.*, 1992; ver revisão de Hull *et al.*, 1995; ver revisão de Hull *et al.*, 1999). A estimulação da dopamina em várias áreas encefálicas envolvidas no comportamento sexual é requerida para a motivação e a efetividade dos aspectos comportamentais que envolvem a função reprodutiva de ratos machos (Pfaus & Phillips, 1991).

Contudo, apesar da hiperprolactinemia aguda facilitar o comportamento sexual de machos, talvez pela indução da secreção de dopamina, os efeitos da PRL sobre o comportamento sexual também são descritos como nulos ou inibidores, de acordo com padrão de concentração plasmática do hormônio (Drago, 1984; Mas, Fumero & Gonzalez-Mora, 1995). O tratamento central e/ou crônico de PRL tem produzido efeito inibitório sobre o comportamento sexual de ratos machos, sugerindo que os efeitos comportamentais da PRL acontecem de acordo com mudanças na atividade do sistema dopaminérgico

nigroestriatal (Cruz-Casallas *et al.*, 1999). Desde que a PRL plasmática alcança o SNC através de mecanismos de transporte ativo (Cooke, 1989; Felicio & Bridges, 1992), a estimulação prolongada do sistema dopaminérgico central, através da hiperprolactinemia crônica, causa hipossensibilidade ou *down regulation* dos receptores centrais de dopamina (ver revisão de Drago, 1984; Mohankumar *et al.*, 1997), suprimindo a motivação sexual e levando à disfunção sexual (Drago & Lissandrelo, 2000; ver revisão de Krüger *et al.*, 2002). A hiperprolactinemia crônica pode levar ao rompimento da atividade dopaminérgica central, causando prejuízo no comportamento sexual.

Portanto, considerando que a PRL plasmática promove efeitos a curto prazo, como a melhora da motivação sexual e efetividade do comportamento sexual, e a longo prazo, como a redução do comportamento sexual, a duração da hiperprolactinemia é importante para a expressão dos efeitos comportamentais da PRL (Drago & Lissandrelo, 2000).

Nossos resultados sugerem que a redução do comportamento sexual em ratos hipertensos (modelo 2R/1C) pode ser conseqüente tanto do aumento da pressão arterial como do aumento da concentração plasmática de PRL, ou pelo dois fatores atuando de forma sinérgica, já que padrões normais de comportamento sexual, de PRL plasmática e de PAM foram exibidos por animais 2R/1C tratados com nifedipina.

## **6. Ratos 2R/1C apresentam redução do FSH plasmático, independente do tratamento com o bloqueador de canais de cálcio nifedipina.**

Ratos hipertensos (modelo 2R/1C) apresentaram apenas uma tendência à redução das concentrações plasmáticas de LH e FSH em relação aos animais com cirurgia fictícia.

Em contrapartida, uma redução significativa do FSH plasmático apareceu quando ratos 2R/1C receberam veículo ou foram tratados com nifedipina, na comparação aos animais com cirurgia fictícia, nas mesmas condições. Nossos resultados mostraram que o FSH plasmático é mais sensível à redução, quando comparado ao padrão de LH, em ratos machos 2R/1C, independente do tratamento com nifedipina.

Segundo dados da literatura, ratas OVXs e microinjetadas com antisoro específico contra Ang II (imunoneutralização de Ang II), por via icv, apresentaram redução no conteúdo de LHRH imunoreativo em eminência mediana e APOM, e de LH plasmático (Franci, Anselmo-Franci & McCann, 1990). Quando ratas OVXs são microinjetadas com Losartan, um antagonista do receptor AT<sub>1</sub> de Ang II, na APOM, também apresentaram redução da secreção plasmática de LH, mostrando a importância do receptor AT<sub>1</sub> de Ang II na regulação do LH (Dornelles & Franci, 1998a). Nos dois experimentos não houve alteração do FSH plasmático (Franci, Anselmo-Franci & McCann, 1990; Dornelles & Franci, 1998a). Estes dados mostraram que a Ang II modula exclusivamente a secreção plasmática de LH, não interferindo no FSH plasmático em fêmeas.

O efeito da Ang II central sobre a modulação da secreção de LHRH pode ocorrer por ação direta da Ang II sobre seus receptores AT<sub>1</sub>, localizados na APOM, e/ou por ação indireta da Ang II central sobre seus receptores AT<sub>1</sub> pré-sinápticos, localizados sobre os terminais nervosos que ascendem para as fibras noradrenérgicas, facilitando a liberação de noradrenalina, as quais fazem sinapse com neurônios sintetizadores de LHRH (ver revisão de Saavedra, 1992; ver revisão de Lenkei *et al.*, 1997). Assim, o aumento da estimulação do SRA central na hipertensão renovascular 2R/1C (Martinez-Maldonado, 1991; Nishimura *et al.*, 1992; Kagiya *et al.*, 2001) pode estar ativando um mecanismo de *down-regulation* dos receptores AT<sub>1</sub> de Ang II tanto nos neurônios LHRH da APOM

quanto nas fibras noradrenérgicas que ascendem para neurônios LHRH, o que, poderia impedir a secreção de LHRH e, portanto, justificar o não aumento das concentrações plasmáticas de LH e FSH em ratos 2R/1C.

Em nossos resultados, ratos 2R/1C tratados com nifedipina exibiram uma redução semelhante do FSH plasmático quando comparados aos animais 2R/1C em uso de veículo.

A nifedipina está envolvida na síntese de NO (Dhein *et al.*, 1999; Fukuo *et al.*, 2002). Estudos *in vitro* mostraram que o NO tem ação como neuromodulador da secreção de LHRH, por gerar de GMPc (Moretto, López & Negro-Vilar, 1993) ou gerar prostaglandina E<sub>2</sub>, a qual aumenta AMPc, o que induz à excitação do LHRH (ver revisão de McCann *et al.*, 1999). Isto acontece por difusão do NO para os neurônios LHRH, já que RNAm para óxido-nítrico sintetase e para LHRH não coexistem em neurônios LHRH (Grossman *et al.*, 1994). Diante destes dados, o tratamento com nifedipina poderia ter facilitado a secreção de LHRH, e portanto, das gonadotrofinas, o que contraria nossos resultados. Uma suposta ação limitante da Ang II elevada poderia estar sobrepondo a ação do NO sobre a secreção do FSH plasmático nos ratos 2R/1C tratados com nifedipina.

Células de hipotálamo médio-basal de ratos machos, em cultura com nitroprussiato de sódio, um doador de NO, mostraram uma redução na secreção de noradrenalina e aumento na secreção de GABA; na presença de um inibidor da óxido-nítrico sintetase, ocorre a liberação de noradrenalina e inibição de GABA (Seilicovich *et al.*, 1995). Este estudo mostrou uma ação reguladora do NO sobre a secreção de noradrenalina e GABA, que estimula e inibe, respectivamente, a liberação de LHRH, modulando, assim, a secreção deste hormônio para a adenohipófise. Portanto, o NO atua como um neuromodulador indireto da secreção pulsátil de LHRH mediando a liberação das gonadotrofinas (Seilicovich *et al.*, 1995).

Considerando que a nifedipina é um bloqueador de canais de cálcio, esta pode agir como um inibidor das células adenohipofisiárias que requerem cálcio para a secreção de seus hormônios. O uso da nifedipina pode ter inibido a secreção das gonadotrofinas e, conseqüentemente, de testosterona via bloqueio do influxo de cálcio nos gonadotrofos. Estudos em células isoladas de gonadotrofos demonstraram que a inativação da corrente de cálcio, em canais de cálcio tipo L, atenua a secreção de LH durante a ação do LHRH (Stojilkovic *et al.*, 1990).

**7. Ratos 2R/1C apresentam redução da testosterona plasmática; entretanto, quando tratados com o bloqueador de canais de cálcio nifedipina, mantêm a redução da testosterona plasmática e exibem um comportamento sexual normal.**

Ratos 2R/1C apresentaram uma redução da concentração plasmática de testosterona quando comparados aos animais com cirurgia fictícia. Este efeito foi reproduzido quando ratos 2R/1C receberam veículo ou foram tratados com nifedipina. A redução da testosterona plasmática ocorre exclusivamente nos animais 2R/1C, independente do tratamento com nifedipina. Mesmo com reduzida testosterona plasmática, animais 2R/1C tratados com nifedipina exibiram uma performance sexual semelhante aos animais com cirurgia fictícia.

Em muitas espécies de mamíferos, o comportamento reprodutivo dos machos é dependente das concentrações plasmáticas de androgênios (Meisel & Sachs, 1994), onde o comportamento de cópula é eliminado após a castração e reaparece com a administração de testosterona exógena (Hart, Wallach & Melese-D'Hospital, 1983). Neste contexto, o

tratamento sistêmico e crônico, ou a administração icv de propionato de testosterona, mantém ou restabelece a habilidade copulatória (comportamento de monta, intromissão peniana e ejaculação) de ratos castrados (Roselli & Chambers, 1999); e mais, em ratos machos castrados, a reposição sc de propionato de testosterona, por um período de cinco dias, restabelece a cópula e a responsividade da APOM ao neurotransmissor dopamina, em experimento com microdiálise (Putman *et al.*, 2001). A redução na liberação, e não na síntese, de dopamina na APOM foi observada em ratos castrados, perante a uma fêmea receptiva sexualmente, quando comparados aos não-castrados, e mais, o bloqueio da enzima óxido-nítrico sintase em ratos não-castrados inibe a cópula induzida pela liberação de dopamina na APOM; estes dados sugerem que a testosterona pode restabelecer o comportamento de cópula por promover uma *up-regulation* da enzima óxido nítrico-sintetase em terminações dopaminérgicas, o que, em resposta, realça a liberação de dopamina na APOM em ratos não-castrados (Hull *et al.*, 1997). Dados recentes mostraram que a administração de propionato de testosterona, diretamente no VMH de ratos machos castrados, induz ao restabelecimento da motivação sexual (Harding & McGinnis, 2003).

Historicamente, o sistema dopaminérgico na APOM tem sido identificado como o mais importante para a efetivação da copulação: o bloqueio dos receptores de dopamina reduz a frequência de cópula, o número de ereções e a motivação sexual; por outro lado, a estimulação dos receptores deste sítio encefálico facilita a cópula, os reflexos penianos (ereções) e as anteroflexões (ver revisão de Wood, 1997; ver revisão de Hull, Muschamp & Sato, 2004). Em ratos machos, lesões eletrolíticas e citotóxicas na APOM ou na BSTN abolem a cópula, mantendo a integridade das respostas sensório-motoras e autonômicas, necessárias para o comportamento sexual (Liu, Salamone & Sachs, 1997).

Vários trabalhos descrevem a importância da testosterona sobre o comportamento reprodutivo em machos (Roselli & Chambers, 1999; Meisel & Sachs, 1994; Hart, Wallach & Melese-D'Hospital, 1983). Entretanto, seus dois maiores metabólitos DHT e estradiol são complementares para a manutenção do comportamento de cópula e secreção de dopamina na APOM: injeções sc diárias com uma mistura de estradiol e DHT (benzoato) realçaram a secreção dopaminérgica pré-copulatória em ratos castrados (Putnam, Sato & Hull, 2003).

Estudos sobre o sistema reprodutor masculino apontam a testosterona como um agente fisiológico importante da perfusão genital. Becker e colaboradores (2001) descreveram que as concentrações de testosterona plasmática, obtidas nos corpos cavernosos, estão relacionadas ao aumento do fluxo sanguíneo durante a estimulação sexual, propiciando a ereção peniana. Entretanto, concentrações plasmáticas de testosterona rapidamente são reduzidas durante a detumescência peniana (ver revisão de Littleton-Kearney & Hurn, 2004).

Dados prévios revelaram a existência de uma associação entre homens hipertensos e redução da concentração plasmática de testosterona (Fogari *et al.*, 2002). A interação entre testosterona e elevação da pressão sanguínea sugere que a redução da testosterona plasmática possa contribuir para o aumento da resistência da parede arterial nos homens hipertensos, podendo ser, em parte, responsável pela atividade sexual prejudicada dos mesmos (Kapasi *et al.*, 1996; Fogari *et al.*, 2002).

A presença de uma enzima imunoreativa semelhante à renina e de RNAm para renina nas células de Leydig indica a presença de um SRA testicular (Parmentier *et al.*, 1983; Deschepper *et al.*, 1986). Além disto, as angiotensinas circulantes têm acesso aos receptores de Ang II nas células de Leydig (ver revisão de Ganong, 1995; ver revisão de

Speth, Daubert & Grove, 1999). A ativação dos receptores de Ang II nas células de Leydig inibe a rota do AMPc necessária para a ligação do LH nos seus respectivos sítios; o impedimento da ação do LH sobre as células de Leydig suprime a síntese de testosterona (Khanum & Dufau, 1988). A Ang II, sabidamente elevada nos animais 2R/1C, pode ser um dos fatores atuantes na redução da testosterona plasmática via bloqueio dos receptores de LH nos testículos.

Efeitos sobre a testosterona plasmática também têm sido atribuídos à PRL. A administração ip de domperidone, um antagonista do receptor D<sub>2</sub> de dopamina, por trinta dias consecutivos, induziu à hiperprolactinemia e promoveu redução da testosterona plasmática em ratos (Nasello *et al.*, 1997). Katovich e colaboradores (1985) mostraram que a hiperprolactinemia promove uma redução de LH plasmático e da proteína ligante de androgênio, o que reduz a secreção de testosterona pelo testículo. Huang e colaboradores (2001) descreveram que a hiperprolactinemia pode hipossensibilizar as células de Leydig aos estímulos hormonais, diminuindo a secreção, porém, não a síntese de testosterona, em cultura de células de testículo de ratos. Na presença de hiperprolactinemia crônica, a reposição de testosterona plasmática não traz benefícios sobre comportamento sexual (ver revisão de Speth, Daubert & Grove, 1999).

Nossos resultados mostraram uma redução da testosterona plasmática em ratos hipertensos (modelo 2R/1C) associado a uma diminuição do comportamento sexual. A Ang II, supostamente elevada, e/ou a hiperprolactinemia podem ter inibido a secreção de LH pelos gonadotrofos na adenohipófise, como também impedido a ligação do LH no meio intra-testicular; ambos os efeitos repercutem na redução da secreção de testosterona plasmática.



Curiosamente, o tratamento com nifedipina manteve o comportamento sexual normalizado nos ratos 2R/1C, apesar da testosterona plasmática encontrar-se reduzida. A síntese de NO, facilitada pelo tratamento com nifedipina, pode ser apontada como um fator de melhora do comportamento sexual, junto à concentração plasmática normal de PRL e à pressão arterial normal, também associadas ao tratamento com nifedipina, sendo que o conjunto destes eventos podem ter superposto à redução da testosterona plasmática.

Podendo ser a Ang II ou a PRL os agentes causais da redução da testosterona plasmática, o fato é que o efeito sobre o andrógeno pode ser o responsável pela diminuição do comportamento sexual em ratos machos 2R/1C.

Além da presença de testosterona plasmática, de igual importância é a veno-oclusão necessária para o aumento da pressão intracavernosa que torna efetiva a ereção peniana. Os andrógenos controlam o mecanismo de veno-oclusão, indiretamente, por um mecanismo dependente de NO. Portanto, uma deficiência na produção de NO é a base subjacente para o fracasso da veno-oclusão, como acontece nos ratos castrados (Dai *et al.*, 1999).

#### **8. Ratos 2R/1C apresentam redução do quociente de espermátides e aumento do trânsito epididimário; o tratamento com o bloqueador de canais de cálcio nifedipina não reverte os efeitos sobre a espermatogênese.**

Ratos 2R/1C apresentaram redução do quociente de espermátides e aumento do trânsito epididimário quando comparados aos animais fictícios. Este efeito foi mantido quando ratos 2R/1C receberam veículo ou foram tratados com nifedipina. A redução do

quociente de espermátides e aumento do trânsito epidimário ocorreram exclusivamente nos animais 2R/1C, independente do tratamento com nifedipina.

Evidências sugerem a existência de um SRA local em gônadas masculina; neste contexto, a ligação da Ang II aos seus receptores, principalmente ao receptor AT<sub>1</sub>, estimula o transporte de espermatozóides e regula o balanço hidreletrolítico local, ambos necessários para a maturação dos espermatozóides, em epidídimo (ver revisão de Speth, Daubert & Grove, 1999).

Em ratos, a localização dos receptores de PRL sobre as células de Sertoli, bem como a ação regulatória das células de Sertoli pelo FSH plasmático, sugerem que a PRL possa ser um potencial regulador da espermatogênese (Guillaumot & Benahmed, 1999). Entretanto, somente em excesso, como no caso da hiperprolactinemia, tem sido evidenciado hipogonadismo e inibição da espermatogênese (Bartke, 1980).

Efeitos adversos sobre o potencial de fertilidade têm sido atribuídos para a administração terapêutica dos bloqueadores de canais de cálcio, sugerindo que estes medicamentos possam ser possíveis agentes contraceptivos masculino (Almeida *et al.*, 2000). O bloqueador de canais de cálcio amlodipina, administrado por via sc, promoveu uma diminuição na produção de espermátides e na densidade de espermatozóides em ratos (Almeida *et al.*, 2000).

Visto que o tratamento com nifedipina não alterou a espermatogênese nos animais pertencentes ao grupo da cirurgia fictícia, podemos sugerir que a nifedipina não apresentou efeito direto sobre os canais de cálcio no parênquima testicular. Estudos *in vitro* mostraram que o pH necessário para a permeabilidade do canal de cálcio não foi modificado na presença da nifedipina em tecido testicular, ao contrário de outros

bloqueadores de cálcio, sugerindo que a nifedipina parece facilitar a regulação da maturação dos espermatozóides (Santi *et al.*, 1998).

Nossos resultados também mostraram que o tratamento com nifedipina não reverteu a redução do FSH plasmático e, conseqüentemente, o déficit da espermatogênese em ratos 2R/1C, apesar de promover valores normais de pressão arterial.

Uma explicação plausível para o déficit da espermatogênese em animais com valores pressóricos normais e comportamento sexual normal seria que o aumento da Ang II no modelo 2R/1C possa estar interferindo na ligação do LH em seus receptores testiculares, e, assim, comprometendo a secreção de testosterona, necessária para a ativação do processo espermatogênico, incluindo a maturação dos espermatozóides.

Também, a hiperprolactinemia exibida pelos ratos 2R/1C pode estar hiposensibilizando as células de Leydig a reagirem ao LH (Huang *et al.*, 2001), como, também, o aumento da PRL pode estar causando uma *down-regulation* nos receptores de PRL nas células de Sertoli, sendo que ambos os efeitos levam ao comprometimento da maturação espermatogênica.

## ***CONCLUSÕES***

---

Com base nos resultados, foram formuladas as seguintes conclusões:

- Animais com hipertensão induzida pelo modelo 2R/1C apresentaram alteração significativa nos seguintes desfechos reprodutivos: (a) redução da frequência de monta com intromissão, (b) aumento da latência de monta com intromissão, (c) aumento da latência de ejaculação, (d) aumento da duração do intervalo pós-ejaculário, (e) aumento da concentração plasmática de PRL, (f) redução da testosterona plasmática, (g) redução do quociente espermático, e (i) aumento do trânsito epidimário. Ao serem tratados com nifedipina, ratos 2R/1C apresentaram: (a) aumento da frequência de monta com intromissão, (b) redução da latência de monta com intromissão, (c) redução da latência de ejaculação, (d) redução da duração do intervalo pós-ejaculário, (e) concentração normal de PRL plasmática, (f) redução da testosterona plasmática, (g) redução do quociente espermático, e (i) aumento do trânsito epidimário.
- O impedimento em aumentar a PAM, devido ao tratamento com o bloqueador de canais de cálcio nifedipina, está associado a um padrão normal do comportamento sexual de ratos machos 2R/1C;
- O comportamento sexual normal ocorre junto a PAM e PRL plasmática, ambas normais, com exceção da espermatogênese, em ratos clipados na artéria renal e tratados com nifedipina;
- A PAM normal, devido ao tratamento com o bloqueador de cálcio nifedipina, impede a ocorrência dos efeitos deletérios da hipertensão renovascular (modelo 2R/1C) sobre o comportamento sexual;

- O tratamento com o bloqueador de cálcio nifedipina impediu a redução da função sexual, com exceção da espermatogênese, não por um efeito direto, mas manter os valores de PAM normais de ratos machos 2R/1C;
- O tratamento com o bloqueador de canal de cálcio nifedipina não causa efeito intrínseco sobre a função reprodutiva de ratos machos 2R/1C e controles;
- A elevação plasmática e/ou central da AngII, sabidamente elevada no modelo 2R/1C, parece não ter sido um fator decisivo para a disfunção reprodutiva de ratos machos neste estudo;
- A hipertensão renovascular induzida pelo modelo 2R/1C promoveu efeito crônico sobre a espermatogênese de ratos machos, o que não foi revertido com o tratamento com o bloqueador de canal de cálcio nifedipina;
- O aumento da PRL plasmática pode ser um dos fatores causais da piora da função reprodutiva em ratos machos com hipertensão induzida pelo modelo 2R/1C;
- Fatores endócrinos como PRL, LH, FSH e testosterona interagem na modulação da função reprodutiva, onde alguns fatores podem estar se sobrepondo funcionalmente a outros.

## ***CONSIDERAÇÕES FINAIS***

---

O conjunto dos resultados deste estudo mostrou que o aumento da pressão arterial parece ser o grande responsável pelas alterações da função reprodutiva, já que valores normais de PAM coincidem com efeitos favoráveis na reprodução, principalmente sobre o comportamento sexual. A AngII parece agir como um dos mediadores dos efeitos sobre a função reprodutiva.

Alterações da PRL, testosterona e FSH plasmáticos podem ter sido causa ou consequência do prejuízo reprodutivo. Porém, o tratamento com nifedipina mostrou que, mesmo no modelo 2R/1C, onde a AngII permanece elevada, alguns efeitos negativos foram abolidos sobre a função reprodutiva. Isto nos faz pensar que, ao contrário de um fator isolado, uma gama de fatores interrelacionados podem estar modificando a fisiologia normal da reprodução na doença hipertensiva.

O progresso na compreensão de uma associação entre a hipertensão e função reprodutiva pode facilitar o controle clínico da disfunção sexual e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. A continuação deste estudo pode servir com subsídio para um melhor entendimento das relações causais nesta temática. A preservação da função sexual normal precisa ser considerada no acompanhamento terapêutico do paciente hipertenso.



## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

ACAR, D.; CAYAN, S.; BOZLU, M. & AKBAY, E. Is routine hormonal measurement necessary in initial evaluation of men with erectile dysfunction? *Arch. Androl.* 50(4): 247-53; 2004.

AGMO, A. Male rat sexual behavior. *Brain Research Protocols*, 1: 203-9, 1997.

AGUILERA, G.; HYDE, C.L. & CATT, K.J. Angiotensin II Receptors and Prolactin Release in Pituitary Lactotrofos. *Endocrinology*, 111 (4): 1045-50, 1982.

ALMEIDA, S.A.; TEÓFILO, J.M.; FRANCI J.A.A.; BRENTGANI, L.G. & LAMANO-CARVALHO T.L. Antireproductive effect of the calcium channel blocker amlodipine in male rats. *Exp. Toxic. Pathol.*; 52:353-6; 2000.

ANDREOLI, T.E., CULPEPPER, R.M., THOMPSON, C.S. & WEINMAN, E.J. Hipertensão Arterial. In: ANDREOLI, T.E., CARPENTER, C.J., PLUM, F. & SMITH, L.S.J., eds. *Medicina Interna Básica*, 2ª ed., 28:176-180, 1991.

BABICHEV, V.N.; SHISHKINA, I.V. & PERYSHKOVA, T.A. The effect of neonatal castration of male rats on the level of sex-hormone receptors in the hypothalamus and hypophysis of adult animals. *Biomed Science*; 1(2):189-92; 1990.

BARTKE, A. role of prolactin in reproduction in male mammals. *Federation Proceeding*, 39(8): 2577-81; 1980.

BEACH, F. A. Cerebral and hormonal control of reflexive mechanisms involved in copulatory behavior. *Endocrinology*, 47(57): 289-316, 1967.

BEAN, N. J., NUNEZ, A .A . & CONNER, R. Effects of medial preoptic lesions on male mouse ultrasonic vocalizations and copulatory behavior. *Brain Research Bulletin*, 6: 109-12, 1981.

BECKER, A.J.; UCKERT, S.; STIEF, C.G.; SCHELLER, F.; KNAPP, W.H.; HARTMANN, U. & JONAS, U. Plasma levels of angiotensin II during different penile conditions in the cavernous and systemic blood of healthy men and patients with erectil dysfunction. *Urology*, 58:805-10, 2001.

BEHR-ROUSSEL, D.; CHAMIOT-CLERC, P.; BERNABE, J.; MEVEL, K.; ALEXANDRE, L.; SAFAR, M.E. & GIULIANO, F. Erectile dysfunction in

spontaneously hypertensive rats: pathophysiological mechanisms. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*; 284:R682-8; 2003.

BEHR-ROUSSEL, D.; GORNY, D.; MEVEL, K.; COMPAGNIE, S.; KERN, P.; SIVAN, V.; BERNABE, J.; BEDIGIAN, M.P.; ALEXANDRE, L. & GIULIANO, F. Erectile dysfunction: an early marker for hypertension? A longitudinal study in spontaneously hypertensive rats. *American Journal Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*; 288(1): R276-83; 2005.

BENARROCH, E.E. & SCHMEICHEL, A.M. Immunohistochemical localization of angiotensin II type 1 receptor in human hypothalamus and brainstem. *Brain Research*, 812:292-6, 1998.

BEN-JONATHAN, N. Dopamine: a prolactin-inhibiting hormone. *Endocrine Review*; 6: 564-89; 1985.

BERGADÁ, C. Função endócrina do testículo. Em: CINGOLANI, H.E. & HOUSSAY, A.B., eds. *Fisiologia Humana de Houssay*; Artmed: Porto Alegre; 7ª ed.; 54: 695-704; 2004.

BIALEK, M.; ZAREMBA, P.; BOROWICZ, K.K. & CZUCZWAR, S.J. Neuroprotective role of testosterone in the nervous system. *Polish Journal of Pharmacology*, 56: 509-18; 2004.

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

BITRAN, D. & HULL, E. Pharmacological analysis of male rat sexual behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 11: 365-389, 1987.

BOLE-FEYSOT, C.; GOFFIN, V., EDERY, M.; BINART, N. & KELLY, P.A. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor Knockout mice. *Endocrine Review*; 19(3): 225-68; 1998.

BOTTARI, S. P., GASPARO, M., STECKELINGS, U. M., & LEVENS, N. R. Angiotensin II receptor subtypes: characterization, signalling mechanisms and possible physiological implications. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 14(2): 123-71, 1993.

BREIGEIRON, M.K.; MORRIS, M.; LUCION A.B. & SANVITTO, G.L. Effects of angiotensin II microinjected into medial amygdala on male sexual behavior in rats. *Hormones and Behavior*; 41:267-74, 2002.

BRILLA, C.G. Regression of myocardial fibrosis in hypertensive heart disease: diverse effects of various antihypertensive drugs. *Cardiovascular Research*; 46: 324-31; 2000.

BROTOS, F.B.; CAMPOS, J.C.; GONZALEZ-CORREALES, R.; MARTIN-MORALES, A.; MONCADA, I. & POMEROL, J.M. Core document on erectile dysfunction: key aspects in the care of a patient with erectile dysfunction. *Int. J. Impot. Res.*; Suppl.; 2:S26-39, 2004.

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

BUDAVARI, S.; O'NEIL, M.J.; SMITH, A.; HECKELMAN, P.E. & KINNEARY, J.F. The merck index. *Merck Research Laboratories*; 6617:1121; 1996.

BURCHARDT, M.; BURCHARDT, T.; BAER, L.; KISS, A.J.; PAWAR, R.V.; SHABSIGH, A.; De La TAILLE, A.; HAYEK, O.R. & SHABSIGH, R. Hipertension is associated with severe erectile dysfunction. *The Journal of Urology*, 164: 1188-91, 2000.

CARRETERO, O.A. & OPARIL, S. Essential hypertension – Part I: definition and etiology. *Circulation*; 101(3): 329-335, 2000.

CATTERALL, W.A. & STRIESSNIG, J. Receptor sites for Ca<sup>2+</sup> channel antagonists. *Trends Pharmacol Science*; 13: 256-62; 1992.

ČERVENKA, L.; HORÁČEK, V.; VANĚČKOVÁ, I.; HUBÁČEK, J.A.; OLIVERIO, M.I.; COFFMAN, T.M. & NAVAR, L.G. Essential role of AT<sub>1A</sub> receptor in the development of 2K/1C hypertension. *Hypertension*, 40: 735-41; 2002.

CHAN, P., LIU, J-C., TONG Y-C., CHEN Y-J., WANG C-C., TOMLINSON, B. & CHENG J-T. Effects of losartan on the sexual behavior of male rats. *Pharmacology*, 58: 132-9, 1999.

CHEN, C.; DUN, S.L.; DUN, N.J. & CHANG, J.K. Prolactin-releasing peptide-immunoreactivity in A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> noradrenergic neurons of the rat medulla. *Brain Research*; 822: 276-9; 1999.

CHENG, K.W. & LEUNG, P.C. The expression, regulation and signal transduction pathways of the mammalian gonadotropin-releasing hormone receptor. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 78: 1029-52; 2000.

CLARK, J. T. A possible role for angiotensin II in the regulation of male sexual behavior in rats. *Physiology & Behavior*, 45: 221-46, 1989.

CLARK, J.T. Sexual function in altered physiological states: comparison of effects of hypertension, diabetes, hyperprolactinemia, and others to "normal" aging in male rats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*; 19(2): 279-302; 1995.

COOKE, N.E. Prolactin: normal synthesis, regulation, and actions. In: DEGROOT, L.J., ed. *Endocrinology*; W.B. Saunders Company: Philadelphia; 2<sup>a</sup> ed.; 1(30): 384-405; 1989.

CRUZ-CASALLAS; P.E.; NASELLO, A.G.; HUCKE, E.E.T.S. & FELICIO, L.F. Dual modulation of male sexual behavior in rats by central prolactin: relationship with in vivo striatal dopaminergic activity. *Psychoneuroendocrinology*; 24:681-93; 1999.

CULLER, M.D. & NEGRO-VILAR, A. Evidence that pulsatile follicle-stimulating hormone secretion is independent of endogenous luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology*; 118: 609-12; 1986.

DAI, Y.; STOPPER, V.; LEWIS, R. & MILLS T. Effects of castration and testosterone replacement on veno-occlusion during penile erection in the rat. *Asian J. Androl.*, 1: 53-9, 1999.

DAMSMA, G. PFAUS, J.G.; WEKSTERN, D.; PHILLIPS, A.G. & FIBIGER, H.C. Sexual behavior increases dopamine transmission in the nucleus accumbens and striatum de male rats: comparison with novelty and locomotion. *Behavior Neuroscience*; 106: 181-91; 1992.

DAVIDSON, J.M. Characteristics of Sex behavior in male rats following castration. *Animal Behavior*, 14: 266-272, 1966.

DeFORREST, J.M.; KNAPPENBERGER, R.C.; ANTONACCIO, M.J.; FERRONE, R.A. & CREEKMORE, J.S. Angiotensin II is a necessary component for the development of hypertension in the two kidney, one clip rat. *The American Journal of Cardiology*, 49: 1515-7, 1982.

DePAOLO, L.V.; BICSAK, T.A.; ERICKSON, G.F.; SHIMASAKI, S. & LING, N. Follistatin and activin: a potential intrinsic regulatory system within diverse tissues. *Experimental Biology and Medicine*; 198: 500-12; 1991.

DESCHEPPER, C.F.; MELLON, S.H.; CUMIN, F.; BAXTER, J.D. & GANONG, W.F. Analysis by immunocytochemistry and in situ hybridization of renin and its mRNA in kidney, testis, adrenal, and pituitary of the rat. *Proc Natl. Acad. Science USA*. 83(19): 7552-6; 1986.

DHEIN, S.; SALAMEH, A.; BERKELS, R. & KLAUS, W. Dual mode of action of dihydropyridine calcium antagonists: a role for nitric oxide. *Drugs*. 58(3): 397-404; 1999.

DOMINGUEZ, J.; RIOLO, J.V.; XU, Z. & HULL, E.M. Regulation by the medial amygdala of copulation and medial preoptic dopamine release. *The Journal of Neuroscience*; 21(1): 349-55; 2001.

DORNELLES, R.C.M. & FRANCI, C.R. Action of AT<sub>1</sub> subtype angiotensin II receptors of the medial preoptic area on gonadotropins and prolactin release. *Neuropeptides*; 32(1):51-5; 1998a.

DORNELLES, R.C.M. & FRANCI, C.R. Alpha- but not beta-adrenergic receptors mediate the effect of angiotensin II in the medial preoptic area on gonadotropin and prolactin secretion. *European Journal of Endocrinology*; 138: 583-86; 1998b.

DRAGO, F. & LISSANDRELLO, C.O. The "low-dose" concept and the paradoxal effects of prolactin on grooming and sexual behavior. *European Journal of Pharmacology*, 405:131-7; 2000.

DRAGO, F. Prolactin and sexual behavior: a review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*; 8:433-9; 1984.

ENJALBERT, A.; SLADDECZEK, F.; GUILLON, G.; BERTRAND, P.; SHU, C.; EPELBAUM, J.; GARCIA-SAINZ, A.; JARD, S.; LOMBARD, C.; KORDON, C. &

BOCKAERT, J. Angiotensin II and dopamine module both cAMP and inositol phosphate productions in anterior pituitary cells – involvement in prolactin secretion. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(9): 4071-5, 1986.

EXTON, M.S.; KRÜGER, T.H.; BURSCH, N.; HAAKE, P.; KNAPP, W.; SCHEDLOWSKI, M. & HARTMANN, U. Endocrine response to masturbation-induced orgasm in healthy men following a 3-week sexual abstinence. *World J. Urol.* 19(5): 377-82; 2001.

FELDMAN, H.A.; GOLSTEIN, I.; HATZICHRISTON, D.G.; KRANE, R.J. & MCKINLAY, J.B. Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts male aging study. *J. Urol.*; 151(1):54-61; 1994.

FELICIO, L.F. & BRIDGES, R.S. Domperidone induces a probenecid-sensitive rise in immunoreactive prolactin in cerebroventricular perfusates in female rats. *Brain Research*; 573(1): 133-8; 1992.

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

FERRAZ, M.R.; FERRAZ, M.M.D.; SANTOS, R. & MOURA, R.S. Preventing L-NAME inhibitory effects on rat sexual behavior with hydralazine, isradipine or captopril co-treatment. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*; 75:265-72; 2003.

FERRINI, M.G.; MAGGE, T.R.; VERNET, D.; RAJFER, J. & GONZÁLEZ-CADAVID, N. Penile neuronal nitric oxide synthase and its regulatory proteins are present in hypothalamic and spinal cord regions involved in the control of penile erection. *The Journal of Comparative Neurology*, 458:46-61; 2003.

FIORINO, D.F.; COURRY A. & PHILLIPS, A.G. Dynamic changes in nucleus accumbens dopamine efflux during the coolidge effect in male rats. *The Journal of Neuroscience*; 17(12): 4849-55; 1997.

FITZSIMONS, J. T. Angiotensin, thirst and sodium appetite. *Physiology Review*, 78(3): 583-686, 1998.

FITZSIMONS, J.T. Angiotensin stimulation of the central nervous system. *Review Physiology Biochem. Pharmacology*, 87: 117-59, 1980.

FOGARI, R.; ZOPPI, A.; PRETI, P.; RINALDI, A.; MARASI, G.; VANASIA, A. & MUGELLINI, A. Sexual activity and plasma testosterone levels in hypertensive males. *American Journal of Hypertension*, 15: 217-21, 2002.

FRANCI, C.R.; ANSELMO-FRANCI, J.A. & McCANN, S.M. Angiotensin II antiserum decreases luteinizing hormone-releasing hormone in the median eminence and preoptic area of the rat. *Brazilian Journal Med. Biol. Res.*; 23: 899-901; 1990.

FREEMAN, M.E. The ovarian cycle of the rat. In: KNOBIL, E. & NEILL, J., eds. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; 45: 613-57; 1994.

FREEMAN, M.E.; KANYCSKA, B.; LERANT, A. & NAGY, G. Prolactin: structure, function and regulation of secretion. *Physiological Reviews*; 80 (4): 1523-631; 2000.

FUKUO, K.; YANG, J.; YASUDA, O.; MOGI, M.; SUHARA, T.; SATO, N.; SUZUKI, T.; MORIMOTO, S. & OGIHARA, T. Nifedipine indirectly upregulates superoxide dismutase expression in endothelial cells via vascular smooth muscle cell-dependent pathways. *Circulation*; 106:356-61; 2002.

FUXE, K.; ENEROTH, P.; GUSTAFSSON, J.A.; LOFSTROM, A. & SKETT, P. Dopamine in the nucleus accumbens: preferential increase of dopamine turnover by rat prolactin. *Brain Research*, 122(1): 177-82; 1977.

GALLI, S.M. & PHILLIPS, M.I. Angiotensin II AT<sub>1A</sub> receptor antisense lowers blood pressure in acute 2-kidney, 1-clip hypertension. *Hypertension*; 38(2): 674-8; 2001.

GANONG, W. Reproduction and the renin-angiotensin system. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 19(2):241-50, 1995.

GASPARO, M.; CATT, K.J.; INAGAMI, T.; WRIGHT, J.W. & UNGER, T.H. International union of pharmacology. XXIII. The Angiotensin II receptors. *Pharmacological Reviews*; 52(3): 415-72; 2000.

GIBBS, D.D. & NEILL, J.D. Dopamine levels in hypophysial stalk blood in the rat are sufficient to inhibit prolactin secretion *in vivo*. *Endocrinology*; 102(6):1895-900, 1978.

GIULIANO, F. & RAMPIN, O. Neural control of erection. *Physiology & Behavior*; 83: 189-201; 2004.



GOFFIN, V.; BOUCHARD, B.; ORMANDY, C.J.; WEIMANN, E.; FERRAG, F.; TOURAINE, P.; BOLE-FEYSOT, C.; MAASKANT, R.A.; CLEMENT-LACROIX, P.; EDERY, M.; BINART, N. & KELLY, P.A. Prolactin: a hormone at the crossroads of neuroimmunoendocrinology. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 840: 498-509; 1998.

GOLDBLATT, H.; LYNCH, J.; HANZAL, R.F. & SUMERVILLE, W.W. Studies on experimental hypertension. I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *Journal of Experimental Medicine*; 59: 347-79; 1934.

GOODFRIEND, T. L., ELLIOTT, M.E. & CATT, K. J. Angiotensin receptors and their antagonists. In: WOOD, A. J.J., ed. *Drug Therapy*, 334(25): 1649-54, 1996.

GORCZYNSKA-FJÄLLING, E. The role of calcium in signal transduction processes in Sertoli cells. *Reproductive Biology*; 4(3): 219-241; 2004.

GOUVÊA, S.A.; MOYSÉS, M.R.; BISSOLI, N.S.; PIRES, J.G.P.; CABRAL, A.M. & ABREU, G.R. Oral administration of L-arginine decreases blood pressure and increases renal excretion of sodium and water in renovascular hypertensive rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*; 36: 943-9; 2003.

GREENSTEIN, A.; CHEN, J.; MILLER, H.; MATZKIN, H.; VILLA, Y. & BRAF, Z. Does severity of ischemic coronary disease correlate with erectile function? *Int. Journal Impotence Research*, 9: 123-6; 1997.

GROSSMAN, A.B.; ROSSMANITH, W.G.; KABIGTING, E.B.; CADD, G.; CLIFTON, D. & STEINER, R.A. The distribution of hypothalamic nitric oxide synthase mRNA in relation to gonadotrophin-releasing hormone neurons. *Journal of Endocrinology*; 140: R5-8; 1994.

GUILLAUMOT, P. & BENAHMED, M. Prolactin receptors are expressed and hormonally regulated in rat Sertoli cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 149: 163-8; 1999.

HALBACH, O.B. & ALBRECHT, D. Mapping of angiotensin AT<sub>1</sub> receptors in the rat limbic system. *Regulation Peptides*, 78(1-3): 51-6, 1998.

HARDING, S.M. & MCGINNIS, M.Y. Effects of testosterone in the VMN on copulation, partner preference and vocalizations in male rats. *Hormones and Behavior*, 43: 327-35; 2003.

HARLAN, R.E., SHIVERS, B.D. , MOSS, R.L. , SHRYNE, J.E. & GORSKI, R. A. Sexual performance as a function of time of day in male and female rats. *Biology of Reproduction*, 23: 64-71, 1980.

HARRIS, G.C. & LEVINE, J.E. Pubertal acceleration of pulsatile gonadotropin-releasing hormone release in male rats as revealed by microdialysis. *Endocrinology*; 144(1):163-71; 2003.

HART, B.L.; WALLACH, S.J. & MELESE-D'HOSPITAL, P.Y. Differences in responsiveness to testosterone of penile reflexes and copulatory behavior of male rats. *Hormones and Behavior*; 17(3): 274-83; 1983.

HELENA, C.V.; FRANCI, C.R. & ANSELMO-FRANCI, J.A. Luteinizing hormone and luteinizing hormone-releasing secretion is under *locus coeruleus* control in female rats. *Brain Research*; 955: 245-52; 2002.

HERMANN, U. & HAFEZ, E.S. Prolactin and male reproduction. *Arch Androl.* 6(2): 95-125; 1981.

HINEY, J.K.; SOWER, S.A.; YU, W.H.; McCANN, S.M. & DEES, W.L. 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; 2002.

HIRASAWA, M. & PITTMAN, Q. Nifedipine facilitates neurotransmitter release independently of calcium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 6139-44; 2003.

HIZUME, T., WATANOBE, H.; YONEDA, M.; SUDA, T. & SCHIOTH, H.B. Involvement of prolactin-releasing peptide in the preovulatory luteinizing hormone and prolactin surges in the rat. *Biochem Biophys Res Commun.*; 279(1):35-9; 2000.

HOLMQUIST, F.; HEDLUND, H. & ANDERSSON, K.E. Characterization of inhibitory neurotransmission in the isolated corpus cavernosum from rabbit and man. *Journal of Physiology*; 449: 295-311; 1992.

HORIUCHI, J.; SAIGUSA, T.; SUGIYAMA, N.; KANBA, S.; NISHIDA, Y.; SATO, Y.; HINUMA, S. & ARITA, J. Effects of prolactin-releasing peptide microinjection

into the ventrolateral medulla on arterial pressure and sympathetic activity in rats. *Brain Research*; 958: 201-9; 2002.

HUANG, W.C. Antihypertensive and bilateral renal responses to nifedipine in 2-kidney, 1-clip, Goldblatt hypertensive rats. *Renal Physiology*, 9: 167-76; 1986.

HUANG, W.J.; YEH, J.Y.; KAN, S.F.; CHANG, L.S. & WANG, P.S. Effects of hyperprolactinemia on testosterone production in rat Leydig cells. *Journal of Cell Biochemistry*; 80(3): 313-20; 2001.

HULL, E.M.; DU, J.; LORRAIN, D.S. & MATUSZEWICH. Extracellular dopamine in the medial preoptic area: implications for sexual motivation and hormonal control of copulation. *The Journal of Neuroscience*; 15(11): 7465-71; 1995.

HULL, E.M.; DU, J.; LORRAIN, D.S. & MATUSZEWICH. Testosterone, preoptic dopamine and copulation in male rats. *Brain Research Bull.*; 44: 327-33; 1997.

HULL, E.M.; EATON, R.C.; MARKOWSKI, V.P.; MOSES, J.; LUMLEY, L.A. & LOUCKS, J.A. Opposite influence of medial preoptic D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors on genital reflexes: implications for copulation. *Life Sciences*, 51: 1705-13, 1992.

HULL, E.M.; LORRAIN, D.S.; DU, J.; MATUSZEWICH, L.; LUMLEY, L.A.; PUTNAM, S.K. & MOSES, J. Hormone-neurotransmitter interactions in the control of sexual behavior. *Behavioural Brain Research*; 105(1): 105-116; 1999.

HULL, E.M.; MUSCHAMP, J.W. & SATO, S. Dopamine and serotonin: influences on male sexual behavior. *Physiology & Behavior*; 83: 291-307; 2004.

HURTADO, M.C.C.; PORTIANSKY, E.L.; PÉREZ, N.G.; REBOLLEDO, O.R. & CINGOLANI, H.E. Regression of cardiomyocyte hypertrophy in SHR following chronic inhibition of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *Cardiovascular Research*; 53: 862-8; 2002.

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

JANICKI, P.K.; SIEMBAB, D.; PAULO, E.A. & KRZASCIK, P. Single-dose kinetics of nifedipine in rat plasma and brain. *Pharmacology*. 36(3): 183-7; 1988.

JENSEN, J.; LENDORF, A.; STIMPEL, H.; FROST, J.; IBSEN, H. & ROSENKILDE, P. The prevalence and etiology of impotence in 101 male hypertensive outpatients. *American Journal of Hypertension*, 12: 271-5, 1999.

JOHNSTON, R.E. Olfactory and vomeronasal mechanisms of communication. In: Pfaff, D. W., ed. *Taste, olfaction and the central nervous system*. 322-46, 1985.

JÖHREN, O. & SAAVEDRA, J.M. Expression of AT<sub>1A</sub> and AT<sub>1B</sub> angiotensin II receptor messenger RNA in forebrain of 2-week-old rats. *American Journal of Physiology*, 271:E104-12, 1996.

JÖHREN, O.; IMBODEN, H.; HÄUSER, W.; MAYE, I.; SANVITTO, G.L. & SAAVEDRA, J.M. Localization of Angiotensin-converting enzyme, angiotensin II, angiotensin II receptor subtypes and vasopressin in the mouse hypothalamus. *Brain Research*, 757: 218-27, 1997.

KAASJAGER, K.A.H.; KOOMANS, H.A. & RABELINK, T.J. Effectiveness of enalapril versus nifedipine to antagonize blood pressure and the renal response to endothelin in humans. *Hypertension*, 25: 620-5, 1995.

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

KAKAR, S.S.; MALIK, M.T. & WINTERS, S.J. Gonadotropin-releasing hormone receptor: cloning, expression and transcriptional regulation. *Progress in Brain Research*, 141: 129-47, 2002.

KAMEL, F.; MOCK, E.J.; WRIGHT, W.W. & FRANKEL, A.I. Alterations in plasma concentrations of testosterone, LH and prolactin associated with mating in the male rat. *Hormones and Behavior*, 6: 277-88, 1975.

KAMEL, F.; WRIGHT W.W.; MOCK, E.J. & FRANKEL, A.I. The influence of mating and related stimuli on plasma levels of luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, prolactin and testosterone in the male rat. *Endocrinology*, 101(2): 421-9, 1977.

KAPASI, A.A.; KUMAR, R.; PAULY, J.R. & PANDEY, K.N. Differential expression and autoradiographic localization of atrial natriuretic peptide receptor in spontaneously

hypertensive and normotensive rat testes: diminution of testosterone in hypertensive. *Hypertension*; 28: 847-53; 1996.

KARADENIZ, T.; TOPSAKAL, M.; AYDOGMUS, A. & BASAK, D. Erectile dysfunction under age 40: etiology and role of contributing factors. *Scientific World Journal*; Suppl.; 1: 171-4; 2004.

KATOVICH, M.J.; CAMERON, D.F.; MURRAY, F.T. & GUNSALUS, G.L. Alterations of testicular function induced by hyperprolactinemia in the rat. *Journal of Andrology*, 6(3): 179-89; 1985.

KEATON, A.K. & CLARK, J. Effects of angiotensin II on sexual function, blood pressure and fluid intake are differentially affected by AT-1 receptor blockade. *Physiology & Behavior*, 64(3): 339-346, 1998.

KELLY, D. & JESSEL, T. Sexo e o cérebro. Em: KANDEL, E., SCHWARTZ, J.H. & JESSEL, T.M., eds. *Fundamentos da Neurociência e do Comportamento*, Pretence-Hall do Brasil Ltda: Rio de Janeiro, pgs:463-73, 1997.

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

KEVERNE, E.B. Importance of olfactory and vomeronasal systems for male sexual function. *Physiology & Behavior*; 83: 177-87; 2004.

KHANUM; A. & DUFAU; M. L. Angiotensin II receptors and inhibitory actions in Leydig cells. *The Journal of Biological Chemistry*; 263(11): 5070-4; 1988.

KIRBY, R.F. & BLUMBERG, M.S. Maintenance of arterial pressure in infant rats during moderate and extreme thermal challenge. *Dev. Psychobiol.*; 32: 169-76; 1998.

KLINEFELTER, G.R. & HESS, R.A. Toxicology of the male excurrent ducts and accessory sex glands. In: KORACH, K.S., ed.; *Reproductive and Developmental Toxicology*; Marcel Dekker: New York; 23: 553-91; 1998.

KRÜGER, T.H.; HAAKE, P.; HAVERKAMP, J.; KRAMER, M.; EXTON, M.S.; SALLER, B.; LEYGRAF, N.; HARTMANN, U. & SCHEDLOWSKI, M. Effects of acute prolactin manipulation on sexual drive and function in males. *J. Endocrinol.*; 179 (3): 357-65; 2003.

KRÜGER, T.H.C.; HAAKE, P.; HARTMANN, U.; SCHEDLOWSKI, M. & EXTON, M.S. Orgasm-induced prolactin secretion: feedback control of sexual drive? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*; 26:31-44; 2002.

KUMAGAI, H.; SUZUKI, H.; RYUZAKI, M.; MATSUKAWA, S. & SARUTA, T. Baroreflex control of renal sympathetic nerve activity is potentiated at early phase of two-kidney, one-clip Goldblatt hypertension in conscious rabbits. *Circulation Research*; 67: 1309-22; 1990.

LACHOWICZ, A.; GOOR, F.V.; KATZUR; A. C. BONHOMME, G. & STOJILKOVIC, S.S. Uncoupling of calcium mobilization and entry pathways in endothelin-stimulated pituitary lactotrophs. *The Journal of Biological Chemistry*; 272 (45):28308-14, 1997.

LAFLAMME, L., BRECHLER, V., REUDELHUBER, T.L., GALLO-PAYET, N. & DESCHEPPER, C.F. The renin-angiotensin system in hybrid NG 108-15 cells. Renin gene is from mouse neuroblastoma, angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme genes are of rat glioma origin. *Regulation Peptides*, 77(1-3):9-15, 1998.

LANDAU, T. & MADDEN, J.E. Hormonal regulation of female proceptivity and its influence on male sexual preference in rats. *Physiology & Behavior*, 31: 679-85, 1983.

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

LENKEI, Z.; CORVOL, P. & LLORENS-CORTES, C. The angiotensin receptor subtype AT<sub>1A</sub> predominates in rat forebrain areas involved in blood pressure, body fluid homeostasis and neuroendocrine control. *Molecular Brain Research*; 30: 53-60; 1995.

LEVINE, J.E. New concepts of the neuroendocrine regulation of gonadotropin surges in rats. *Biology of Reproduction*; 56: 293-302; 1997.

LI, C.; CHEN, P & SMITH, S. Morphological evidence for direct interaction between arcuate nucleus neuropeptide Y (NPY) neurons and gonadotropin-releasing hormone neurons and the possible involvement of NPY Y1 receptors. *Endocrinology*; 140(11): 5382-9; 1999.

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

LITTLETON-KEARNEY, M. & HURN, P.D. Testosterone as a modulator of vascular behavior. *Biological Research for Nursing*, 5(4):276-85, 2004.

LIU, Y-C.; SALAMONE, J.D. & SACHS, B.D. Lesions in medial preoptic area and bed nucleus of stria terminalis: differential effects on copulatory behavior and noncontact erection in male rats. *The Journal of Neuroscience*; 17(13): 5245-53; 1997.

LOUTZENHISER, R. & EPSTEIN, M. Effects of calcium antagonists on renal hemodynamic. *American Journal of Physiology*; 249: F619-29; 1985.

LUCION, A. B., RAMOS, R.A., VOGEL, W. & RASIA-FILHO, A.A. Effect of 8-OH-DPAT on sexual behavior of adult and newborn male rats. *Annals of the 1993, Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, Washington, DC, 1993.

LUMPKIN MD, MCDONALD JK, SAMSON WK, MCCANN SM. Destruction of the dorsal anterior hypothalamic region suppresses pulsatile release of follicle stimulating hormone but not luteinizing hormone. *Neuroendocrinology*; 50(2):229-35; 1989.

LYNCH, S.M.; FREI, B. & MORROW, J.D. Vascular superoxide dismutase deficiency impairs endothelial vasodilatador function through direct inactivation of nitric oxide and increased lipid peroxidation. *Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol.*; 17: 2975-81; 1997.

MacLEOD, R.M. & LEHMEYER, J.E. Studies on the mechanism of the dopamine-mediated inhibition of prolactin secretion. *Endocrinology*; 94(4): 1077-85; 1974.

MacLUSKY, N.J.; LIEBERBURG, I. & McEWEN, B.S. The development of estrogen receptor systems in the rat brain: perinatal development. *Brain Research*; 178(1): 129-42; 1979.

MARTINEZ-MALDONADO, M. Pathophysiology of renovascular hypertension. *Hypertension*; 17:707-19; 1991.

MARTINS-AFFÉRI, M.P.; FERREIRA-SILVA, I.A.; FRANCI, C.R. & ANSELMO-FRANCI, J.A. LHRH release depends on *locus coeruleus* noradrenergic

inputs to the medial preoptic area and median eminence. *Brain Research Bulletin*, 61(5): 521-7; 2003.

MAS, M. Neurobiological correlates of masculine sexual behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*; 19(2): 261-77; 1995.

MAS, M.; CASTILLO, A.R.; GUERRA, M.; DAVIDSON, J.M. & BATTANER, E. Neurochemical correlates of male sexual behavior. *Physiology & Behavior*, 41: 341-5, 1987.

MAS, M.; FUMERO, B. & GONZALEZ-MORA, J.L. Voltammetric and microdialysis monitoring of brain monoamine neurotransmitter release during sociosexual interactions. *Behavioural Brain Research*; 71(1-2): 69-79; 1995.

MATSUSAKA, T. & ICHIKAWA, I. Biological functions of angiotensin and its receptors. *Annual Review Physiology*, 59: 395-412, 1997.

MATUSZCZYK, J.V. & LARSSON, K. Sexual orientation and sexual motivation of the adult male rat. *Physiology and Behavior*; 53: 747-50; 1993.

MAZARO, R.; DI STASI, L.C.; FILHO, S.A.V. & KEMPINAS, W.G. Decrease in sperm number after treatment of rats with *Austroplenckia populnea*. *Contraception*; 62: 45-50; 2000.

McCANN, S.M.; MASTRONARDI, C.; WALCZEWSKA, A.; KARANTH, S.; RETTORI, V. & YU, W.H. The role of nitric oxide in reproduction. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*; 32:1367-79; 1999.

McCANN, S.M.; MIZUNUMA, H.; SAMSON, W.K. & LUMPKIN, M.D. Differential hypothalamic control of FSH secretion: a review. *Psychoneuroendocrinology*; 8(3): 299-308; 1983.

McCORMICK, C.M.; FUREY, B.F.; CHILD, M.; SAWYER, M.J. & DONOHUE, S.M. Neonatal sex hormones have "organizational" effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of male rats. *Brain Research-Developmental Brain Research*. 105(2): 295-305, 1998.



McDONALD, J. & CALKA, J. Relationship between neuropeptide Y and luteinizing-hormone-releasing hormone immunoreactivities in the hypothalamus and preoptic region. *Acta Anat. (Basel)*; 151(3): 171-9; 1994.

McGINNIS, M.Y. & DREIFUSS, R.M. Evidence for a role of testosterone-androgen receptor interactions in mediating masculine sexual behavior in male rats. *Endocrinology*; 24(2): 618-26; 1989.

McGREGOR, D.P., MURONE, C., SONG, K., ALLEN, A.M., PAXINOS, G. & MENDELSON, F. A.O. Angiotensin II receptor subtypes in the human central nervous system. *Brain Research*, 675(1-2): 231-40, 1995.

MEISEL, R.L. & SACHS, B.D. The physiology of male sexual behavior. In: KNOBIL, E. & NEILL, J.D., eds. *The Physiology of Reproduction*; 2<sup>a</sup> ed.; Raven Press: New York, 1994.

MEISEL, R.L., LUMIA, A.R. & SACHS, B.D. Effects of olfactory bulb removal and flank shock on copulation in male rats. *Physiology & Behavior*, 25: 383-7, 1980.

MELIS, M.R. & ARGIOLOS, A. Dopamine and sexual behavior. *Neuroscience Biobehavior Review*; 19(1): 19-38; 1995.

MELIS, M.R.; SUCCU, S.; MASCIA, M.S.; CORTIS, L. & ARGIOLOS, A. Extracellular dopamine increases in the paraventricular nucleus of male rats during sexual activity. *European Journal of Neuroscience*; 17(6): 1266-72; 2003.

MENDELSON, S. D. & PFAUS, J. G. Level searching: a new assay of sexual motivation in the male rat. *Physiology & Behavior*, 45: 337-341, 1989.

MITUSHIMA, D.; SHWE, T.T.W. & KIMURA, F. Sexual dimorphism in the GABAergic control of gonadotropin release in intact rats. *Neuroscience Research*; 46(4): 399-405; 2003.

MOHANKUMAR, P.S.; MOHANKUMAR, S.M.J.; QUADRI, S.K. & VOOGT, J.L. Chronic hyperprolactinemia and changes in dopamine neurons. *Brain Research Bulletin*, 42(6): 435-41, 1997.

MOHRI, K.; UESAWA, Y. & SAGAWA, K. Effects of long-term grapefruit juice ingestion on nifedipine pharmacokinetics: induction of rat hepatic P-450 by grapefruit juice. *Drug Metab. Dispos.*, 28(4): 482-6; 2000.

MORETTO, M.; LÓPEZ, F.J. & NEGRO-VILAR, A. Nitric oxide regulates luteinizing hormone-releasing hormone secretion. *Endocrinology*; 133(5): 2399-402; 1993.

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

MORISHITA, R.; HIGAKI, J.; MIYAZAKI, M. & OGIHARA, T. Possible role of the vascular renin-angiotensin system in hypertension and vascular hypertrophy. *Hypertension*; 19 [suppl II]: 62-7; 1992.

MORISHITA, R.; HIGAKI, J.; OKUNISHI, H.; TANAKA, T.; ISHII, K.; NAGANO, M.; MIKAMI, H.; OGIHARA, T.; MURAKAMI, K. & MIYAZAKI, M. Changes in gene expression of the renin-angiotensin system in two-kidney, one clip hypertensive rats. *Journal of Hypertension*; 9: 187-92; 1991.

MORRIS, M.; LI, P.; CALLAHAN, M.F.; OLIVERIO, M.I.; COFFMAN, T.M.; BOSCH, S.M. & DIZ, D.I. Neuroendocrine effects of dehydration in mice lacking the Angiotensin AT<sub>1A</sub> receptor. *Hypertension*; 33(part II): 482-6; 1999.

MOUNZIH, K.; GROVE, K.L.; SPETH, R.C., STEELE, M.K. & GANONG, W.F. Further studies of the site at which angiotensin II acts in the central nervous system to inhibit the secretion of prolactin. *Endocrine Journal*, 2: 41-45; 1994.

MYERS L.S. & STEELE, M.K. The brain renin-angiotensin system and prolactin secretion in the male rat. *Endocrinology*; 129: 1744-8; 1991.

NAFTOLIN, F. Understanding the bases of sex differences. *Science*. 211:1263-4, 1981.

NASELLO, A.G.; VANZELER, M.L.A.; MADUREIRA, E.H. & FELICIO, L.F. Effects of acute and long-term domperidone treatment on prolactin and gonadal hormone levels and sexual behavior of male and female rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*; 58(4):1089-94; 1997.

National Institutes of Health. *Guide for the care and use of laboratory animals (DHEW Publication N° 86-23)*; Washington, DC: U.S. Government Printing Office, 1986.

NEILL, J.D. Neuroendocrine regulation of prolactin secretion. In: MARTINI, L. & GANONG, W.F., eds.; *Frontiers in Neuroendocrinology*; Raven Press; New York; 6(5): 129-55; 1980.

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

NORMAN, J.T. The role of angiotensin II in renal growth. *Renal Physiology Biochemistry*; 14: 175-85; 1991.

ODELL, W.D. Sexual maturation in the rat. In: GRUMBACH, M.M.; SIZONENKO, P.C. & AUBERT, M.L., eds. *Control of the Onset of Puberty*; Williams & Wilkins; London; 183-210; 1990.

PADOIN, M.J.; CADORE, L.P.; GOMES, C.M.; BARROS, H.M. & LUCION, A.B. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. *Behavioral Neuroscience*; 115(6): 1332-40; 2001.

PALMER, A.A., STEELE, M.K., SHACKELFORD, R.L. & GANONG, W.F. Intravenous losartan inhibits the increase in plasma luteinizing hormone and water intake produced by intraventricular angiotensin II. *P.S.E.B.M.*; 205: 263-6, 1994.

PARMENTIER, M.; INAGAMI, T. POCHET, R. & DESCLIN, J.C. Pituitary-dependent renin-like immunoreactivity in the rat testis. *Endocrinology*; 112(4): 1318-23; 1983.

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

PILGRIM, C. & REISERT, I. Differences between male and female brains – developmental mechanisms and implications. *Hormones and Metabolism Research*. 24: 353-9, 1992.

PINILLA, L., GONZALEZ, L.C.; TENA-SEMPERE, M., AGUILAR, E. Interactions between serotonergic and aminoacidergic pathways in the control of PRL secretion in prepubertal male rats. *Journal of Physiological Biochemistry*; 57(3): 237-44; 2001.

PINTO, Y.M.; PAUL, M. & GANTEN, D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovascular Research*; 39: 77-88; 1998.

PLUNKETT, L.M. & SAAVEDRA, J.M. Increased Angiotensin II binding affinity in the nucleus tractus solitarius of spontaneously hypertensive rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 82: 7721-4; 1985.

PUTNAM S.K.; DU, J.; SATO, S. & HULL, E.M. Testosterone restoration of copulatory behavior correlates with medial preoptic dopamine release in castrated male rats. *Hormones and Behavior*; 39: 216-24; 2001.

PUTNAM, S.K.; SATO, S. & HULL, E.M. Effects of testosterone metabolites on copulation and medial preoptic dopamine release in castrated male rats. *Hormones and Behavior*; 44: 419-26; 2003.

RAM, C.V. & FEATHERSTON, W.E. Calcium antagonists in the treatment of hypertension. An overview. *Chest*; 93: 1251-3; 1988.

RAY, P.E.; AGUILERA, G.; KOPP, J.B.; HORIKOSHI, S. & KLOTMAN, P.E. Angiotensin II receptor-mediated proliferation of cultured human fetal mesangial cells. *Kidney Int.*; 40: 764-71; 1991.

REICHLIN, S. Neuroendocrine control of individual pituitary hormones – Neuroendocrine aspects of sexual function. In: WILSON, J.D.; FOSTER, D.W.; KRONENBERG, H.M. & LARSEN, P.R., eds. *Williams Textbook of Endocrinology*; Saunders: Philadelphia; 9<sup>a</sup> ed., 8: 211-6; 1998.

REID, I.A. Is there a brain renin-angiotensin system? *Circulation Research*; 41(2): 147-53; 1977.

RETTORI, V.; BELOVA, N.; DEES, W.L.; NYBERG, C.L. GIMENO; M. & McCANN, M. Role of nitric oxide in the control of luteinizing hormone-releasing hormone release *in vivo* and *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 90:10130-4; 1993.

REYNOSO, R.; MOHN, C.; RETORY, V.; SZWARCFARB, B.; CARBONE, S.; RONDINA, D. & MOGUILVSKY, J.A. Changes in the effect of testosterone on hypothalamic nitric oxide synthetase during sexual maturation. Its relationship with GnRH release. *Neuro Endocrinol. Lett.* 23(2): 101-4; 2002.

ROBB, G.W.; AMMAN, R.P. & KILLIAN, G.J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *Journal of Reproduction Fertil.*; 54(1): 103-7; 1978.

ROBINSON, M.M.; McLENNAN, G.O.; THUNHORST, R.L. & JOHNSON, A.K. Interactions of the systemic and brain renin-angiotensin systems in the control of drinking and the central mediation of pressor responses. *Brain Research*, 842: 55-61, 1999.

ROBYN, C. Physiological and pharmacological factors influencing prolactin secretion and their relation to human reproduction. In: CROSIGNANI, P.G. & ROBYN, C., eds. *Prolactin and Human Reproduction*. Academic Press, London; 71-9; 1971.

ROCCO, A.; FALASCHI, P.; POMPEI, P.; D'URSO, R. & FRAJESE, G. Reproductive parameters in PRLemic men. *Arch. Androl.*, 10(2): 179-83; 1983.

ROSELLI, C.E. & CHAMBERS, K. Sex differences in male-typical copulatory behaviors in response to androgen and estrogen treatment in rats. *Neuroendocrinology*; 69 (4): 290-8; 1999.

RUSSEL, S.T.; KHANDHERIA, B.K. & NEHRA, A. Erectile dysfunction and cardiovascular disease. *Mayo Clin. Proc.*; 79(6): 782-94; 2004.

RUZICKA, M. & LEENEN, F.H.H. Experimental renovascular hypertension: methodological aspects and role of the renin-angiotensin system. In: GANTEN, D. & De JONG, W., eds., *Handbook of Hypertension*, Elsevier Science, 16(3): 49-87, 1994.

SAAVEDRA, J.M. Brain and pituitary angiotensin. *Endocrine Reviews*, 13(2): 329-80, 1992.

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

SACHS, B. & MEISEL, R. The physiology of male sexual behavior. In : KNOBIL, E; NEIL, J.D.; EWING, L.L.; GREENWALD, G.S.; MARKERT, C.L. & PFAFF, D.W.; *The Physiology of Reproduction*. Raven Press: New York, pp.1393-1485, 1988.

SACHS, B. D. & BARFIELD, R. J. Temporal patterning of sexual behavior in the male rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 73(3):359-64, 1970.

SAITOH, Y.; SILVERMAN, A.J. & GIBSON, M.J. Norepinephrine neurons in mouse *locus coeruleus* express c-fos protein after N-methyl-D,L-aspartic acid (NMDA) treatment: relation to LH release. *Brain Research*; 561(1): 11-9; 1991.

SAMSON, W.K.; RESCH, Z.T. & MURPHY, T.C. A novel action of the newly described prolactin-releasing peptides: cardiovascular regulation. *Brain Research*; 858: 19-25; 2000.

SANTI, C.M.; SANTOS, T. HERNÁNDEZ-CRUZ; A. & DARSZON; A. Properties of a novel pH-dependent Ca<sup>2+</sup> permeation pathway present in male germ cells with possible roles in spermatogenesis and mature sperm function. *J. Gen. Physiol.* ; 112: 33-53; 1998.

SANVITTO, G.L., JÖHREN, O., HÄUSER, W. & SAAVEDRA, J.M. Water deprivation upregulates AngII AT<sub>1</sub> binding and mRNA in rat subfornical organ and anterior pituitary. *American Journal of Physiology*, 273 (1 Pt 1):E156-63, 1997.

SEFTEL, A.D.; SUN, P. & SWINDLE, R. The prevalence of hypertension, hyperlipidemia, diabetes mellitus and depression in men with erectile dysfunction. *Journal of Urology*; 171(6 Pt 1): 2341-5; 2004.

SEILICOVICH, A.; LASAGA, M.; BEFUMO, M.; DUVILANSKI, B.H.; DIAZ, M.C.; RETTORI, V. & McCANN, S.M. Nitric oxide inhibits the release of norepinephrine and dopamine from the medial basal hypothalamus of the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92:11299-302; 1995.

SEINO, M.; ABE, K.; ITO, S.; YASUJIMA, M.; CHIBA, S.; HIWATARI, M.; SATO, K.; GOTO, T.; OMATA, K. & TAJIMA, J. Effects of nifedipine on renal vascular responses to vasoactive agents in rabbits. *Tohoku J. Exp. Med*; 142(1): 67-76, 1984. (Abstract)

SELTZER, A.; TSUTSUMI, K.; SHIGEMATSU, K. & SAAVEDRA, J.M. Reproductive hormones modulate Angiotensin II AT<sub>1</sub> receptors in the dorsomedial arcuate nucleus of the female rat. *Endocrinology*; 133: 939-41; 1993.

SHAAR, C.J. & CLEMENS, J.A. The role of catecholamines in the release of anterior pituitary *in vitro*. *Endocrinology*; 95: 1202-12; 1974.

SIGMON, D.H. & BEIERWALTES, W.H. Influence of nitric oxide in the chronic phase of two-kidney, one clip renovascular hypertension. *Hypertension*; 31: 649-656; 1998.

SIMERLY, R.B.; CHANG, C.; MURAMATSU, M. & SWANSON, L.W. 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; 1990.

SONG, K., ALLEN, A. M., PAXINOS, G. & MENDELSON F.A. Mapping of angiotensin II receptor subtype heterogeneity in rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 316: 467-84, 1992.

SPETH, R.C.; DAUBERT, D.L. & GROVE, K.L. Angiotensin II: a reproductive hormone too? *Regulatory Peptides*; 79:25-40; 1999.

SPYER, K.M. Central nervous mechanisms contributing to cardiovascular control. *Journal of Physiology*, 474(1): 1-19, 1994.

STEELE, M.K. & GANONG, W.F. Effects of catecholamine-depleting agents and receptor blockers on basal and angiotensin II-or norepinephrine-stimulated luteinizing hormone release in female rats. *Endocrinology*; 119(6):2728-36; 1986.

STEELE, M.K. & MYERS, L.S. In vivo studies on paracrine actions of pituitary angiotensin II in stimulating prolactin release in rats. *American Journal of Physiology*, 258: E619-24, 1990.

STEELE, M.K. The role of brain angiotensin II in the regulation of luteinizing hormone and prolactin secretion. *Trends Endocrinology and Metabolism*, 3(8): 295-301; 1992.

STEELE, M.K.; BROWNFIELD, M.S. & GANONG, W.F. Immunocytochemical localization of Angiotensin immunoreactivity in gonadotrops and lactotrops of the rat anterior pituitary gland. *Neuroendocrinology*; 35:155-8; 1982.

STEELE, M.K.; GALLO, R.V. & GANONG, W.F. Stimulatory or inhibitory effects of angiotensin II upon LH secretion in ovariectomized rats: a function of gonadal steroids. *Neuroendocrinology*; 40:210-6; 1985.

STEELE, M.K.; GALLO, R. V. & GANONG, W. F. A possible role for the brain renin-angiotensin system in the regulation of LH secretion. *American Journal of Physiology*, 245(14): R805-10; 1983.

STEELE, M.K.; McCANN, S.M. & NEGRO-VILAR, A. Modulation by dopamine and estradiol of the central effects of angiotensin II on anterior pituitary hormone release. *Endocrinology*, 111: 722-9, 1982.

STEELE, M.K.; NEGRO-VILAR, A. & McCANN, S.M. Effect of Angiotensin II on *in vivo* and *in vitro* release of anterior pituitary hormones in the female rat. *Endocrinology*, 109 (3): 893-9; 1981.

STEELE, M.K.; STEPHENSON, K.N.; MEREDITH, J.M. & LEVINE, J.E. Effects of angiotensin II on LHRH release, as measured by *in vivo* microdialysis of the anterior pituitary gland of conscious female rats. *Neuroendocrinology*; 55: 276-81; 1992.

STEGER, R. W. & BARTKE, A. Neuroendocrine control of reproduction. In: MUKHOPADHYAY, A.K. & RAIZADA, M.K., eds. *Tissue Renin-Angiotensin Systems*, Plenum Press: New York; 2: 15-32, 1995.

STOJILKOVIC, S.S. & CATT, K.J. Expression and signal transduction pathways of gonadotropin-releasing hormone receptors. *Recent Progress in Hormone Research*. 50: 161-205; 1995.

STOJILKOVIC, S.S.; IIDA, T.; VIRMANI, M.A.; IZUMI, S-I.; ROJAS, E. & CATT, K.J. Dependence of hormone secretion on activation-inactivation kinetics of voltage-sensitive  $Ca^{2+}$  channels in pituitary gonadotrophs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 87: 8855-9; 1990.

TAYLOR, G. T., WEISS, J. & RUPICH, R. Male rat behavior, endocrinology and reproductive physiology in a mixed-sex, socially stressful colony. *Physiology & Behavior*, 39: 429-33, 1987.

TIMMERMANS, P.B.M.W.M., INAGAMI, T., SAAVEDRA, J.M., ARDAILLOU, R., ROSENFELD, C.R. & MELDENSOHN, F.A.O. Angiotensin receptor subtypes and their pharmacology. In: CUELLO, A.C. & COLLIER, B., eds.; *Pharmacological Sciences Perspectives*, Massachusetts, Birkhäuser Boston, pgs: 37-59, 1995.



TOMÉ, A.R.; SILVA J.C.R.; SOUZA, A.A.A.; MATTOS, J.P.V.; VALE, M.R. & RAO, V.S.N. Possible involvement of nitric oxide in pilocarpine induced seminal emission in rats. *General Pharmacology*; 33:479-85; 1999.

TSUTSUMI, K. & SAAVEDRA, J. M. Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub>) in the rat brain. *American Journal Physiology*, 261: R209-16, 1991.

UNGER, T., CHUNG, O., CSIKOS, T., CULMAN, J., GALLINAT, S., GOHLKE, P., HOHLE, S., MEFFERT, S., STOLL, M., STROTH, U. & ZHU, Y.Z. Angiotensin receptors. *The Journal of Hypertension - Supplement*, 14(5): S95-103, 1996.

VALENTIN, J-P; SECHI, L.A.; GRIFFIN, C.A.; HUMPHREYS, M.H. & SCHAMBELAN, M. The renin-angiotensin system and compensatory renal hypertrophy in the rat. *American Journal of Hypertension*; 10: 397-402; 1997.

VERHAAR, M.C.; HONING, M.L.H.; DAM, T.V.; ZWART, M.; KOOMANS, H.A.; KASTELEIN, J.J.P. & RABELINK, T.J. Nifedipine improves endothelial function in hypercholesterolemia, independently of an effect on blood pressure or plasma lipids. *Cardiovascular Research*; 42: 752-60; 1999.

WINTERS, S. & MOORE, J.P. Intra-pituitary regulation of gonadotrophs in male rodents and primates. *Reproduction*; 128: 13-23; 2004.

WOOD, R. Thinking about networks in the control of male hamster sexual behavior. *Hormones and Behavior*, 32:40-45, 1997.

WOOD, R.I. & NEWMAN, S.W. Hormonal influence on neurons of the mating behavior pathway in male hamsters. In: MICEVYCH, P.E. & HAMMER, R.P.J. eds., *Neurobiological Effects of Sex Steroid Hormones*, Cambridge, Cambridge Univ. Press, pgs: 3-39, 1995.

WRIGHT, J. W. & HARDING J. W. Regulatory role of brain angiotensins in the control of physiological and behavioral responses. *Brain Research Reviews*, 17: 227-262, 1992.

YEBES, E.G.; LI, S. & PELLETIER, G. Role of serotonin in the regulation of prolactin gene expression in the male rat as evaluated by *in situ* hybridization. *Brain Research Bull.*; 34 (5): 437-40; 1994.

YOSHIDA, M.; UEDA, S.; MACHIDA, J.; YANO, S. & AIKOH, I. Effects of nifedipine on renal cortical and medullary blood flow in two-kidney, one-clip renovascular hypertension in rabbits. *Urol. Int.*; 45:284-9, 1990.

ZANATO, V.F.; MARTINS, M.P.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; PETENUSCI, S.O. & LAMANO-CARVALHO, T.L. Sexual development of male Wistar rats. *Brazilian Journal Med. Biol. Research*; 27: 1273-80; 1994.

ZENICK, H.; CLEGG, E.D.; PERREAULT, S.D.; KLINEFELTER, G.R. & GRAY, L.E. Assessment of male reproductive toxicity – A risk assessment approach. In: HAYES, W., ed.; *Principles and Methods of Toxicology*, Raven Press: New York; third edition; 27: 937-88; 1994.

ZHUO, J., MOELLER, I., JENKINS, T., CHAI, S.Y., ALLEN, A. M., OHISHI, M. & MENDELSON, F.A. Mapping tissue angiotensin-converting enzyme and angiotensin AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> and AT<sub>4</sub> receptors. *Journal of Hypertension*; 16 (12 Pt 2): 2027-37, 1998.