

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISIOLOGIA

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA NA
FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NA
OVULAÇÃO DE RATAS OBESAS**

Dissertação de Mestrado

Simone Mattos Louzada

Porto Alegre/RS

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA NA
FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NA
OVULAÇÃO DE RATAS OBESAS**

Simone Mattos Louzada

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Luiz Sanvitto

Co-orientador: Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araujo

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do 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 Mestre em Ciências Biológicas: Fisiologia.

Porto Alegre, 2013.

CIP - Catalogação na Publicação

Louzada, Simone Mattos

Participação do sistema renina angiotensina na formação de espécies reativas de oxigênio na ovulação de ratas obesas / Simone Mattos Louzada. -- 2013. 93 f.

Orientador: Gilberto Luiz Sanvitto.

Coorientador: Alex Sander da Rosa Araujo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Obesidade. 2. Sistema Renina-Angiotensina. 3. Angiotensina II. 4. Ovulação. 5. Espécies reativas de oxigênio. I. Sanvitto, Gilberto Luiz, orient. II. Araujo, Alex Sander da Rosa, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José Antônio e Maria Margarete, pelo amor, dedicação aos seus filhos, educação, apoio e por ensinar que o conhecimento é o bem mais importante.

Aos meus irmãos queridos, Fernanda e Gustavo, e aos demais familiares, pelo apoio e compreensão nos momentos de minha ausência.

Ao meu esposo, Felipe Caron, pelo companheirismo, amor, amizade, dedicação, força e paciência.

Ao meu orientador professor Dr. Gilberto L. Sanvitto pela oportunidade, orientação, confiança e ensinamentos.

Ao meu co-orientador professor Dr. Alex Sander pelo incentivo, paciência, conhecimento e disponibilidade em auxiliar.

Aos amigos pelos momentos de alegria e pelo apoio.

Aos colegas do laboratório 11: Márcia Azevedo, Bruno, Cláudio Felipe, Silvana, Adolfo e Jéferson, por todos os ensinamentos e apoio, e aos demais colegas e alunos de iniciação científica obrigada.

À Tânia Regina Gatteli por sua ajuda e disponibilidade.

À professora Dr.^a Adriane Belló-Klein e seus alunos pelo acolhimento durante as dosagens.

Aos professores do PPG Fisiologia da UFRGS pelo ensino.

Aos bioteristas e veterinários pelo auxílio no cuidado dos animais.

Aos animais pelo sacrifício de suas vidas, por possibilitar o desenvolvimento da ciência.

RESUMO

A prevalência da obesidade tem aumentado em todo mundo, afetando também mulheres em idade reprodutiva. Estudos têm demonstrado que o acúmulo excessivo de tecido adiposo resulta em prejuízos à reprodução feminina. O mecanismo pelo qual a obesidade diminui a fertilidade não está totalmente estabelecido. Atualmente, são propostas a condição inflamatória e a indução de estresse oxidativo como potenciais mecanismos de ação para as patologias relacionadas à obesidade. Adicionalmente, a angiotensina II (Ang II) é mais um fator que tem sido relacionado com alterações associadas à obesidade, e os efeitos deste peptídeo incluem ações pró-inflamatórias e pró-oxidativas. O presente estudo analisou o efeito da obesidade na ovulação e no metabolismo oxidativo ovariano, e a participação da Ang II como um possível modulador da formação de espécies reativas de oxigênio em ovários de ratas obesas e seus efeitos na ovulação. Foram utilizadas ratas submetidas a uma dieta hipercalórica composta por alimentos palatáveis, conhecida como dieta de cafeteria, a partir do desmame até a idade adulta, por um período de 17 semanas. Os animais foram divididos em grupos: CTL (controle), CTL LOS (controle + losartan), CAF (cafeteria) e CAF LOS (cafeteria + losartan). Avaliamos o consumo de alimentos e líquidos, o peso corporal, o peso da gordura abdominal e retroperitoneal, a concentração de insulina plasmática, o número de oócitos, as atividades das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase e catalase), concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e parâmetros de dano oxidativo (lipoperoxidação e oxidação de proteínas). As fêmeas obesas do grupo CAF apresentaram maior consumo de energia e reduzido consumo de água e ração padrão, hiperinsulinemia, aumento das gorduras abdominal e retroperitoneal, e aumento de peso corporal. A obesidade não reduziu significativamente a ovulação, mas aumentou a atividade das enzimas antioxidantes e a concentração de H_2O_2 no ovário. A administração do losartan, em ratas alimentadas com a dieta de cafeteria, reduziu a ingestão energética total, a concentração plasmática de insulina e o ganho de gordura abdominal, mas não evitou o desenvolvimento da obesidade. O losartan inibiu a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase no ovário das ratas obesas do grupo CAF, porém não alterou a atividade da enzima antioxidante catalase. Os resultados deste estudo demonstram que a obesidade resulta em alterações no metabolismo e sugerem a participação da Ang II na formação de espécies reativas de oxigênio no ovário.

Palavras-chave: obesidade, sistema renina-angiotensina, angiotensina II, ovulação, espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

The prevalence of obesity has increased worldwide, also affecting women of reproductive age. Studies have shown that excessive accumulation of adipose tissue results in impaired female reproduction. The mechanism by which obesity reduces fertility is not fully established. Currently, proposals are the inflammatory condition and the induction of oxidative stress as a potential mechanism of action for diseases related to obesity. Additionally, angiotensin II (Ang II) is another factor that has been related to changes associated with obesity, and the effects of this peptide include pro-inflammatory and pro-oxidative actions. The present study considers the effect of obesity on ovulation and ovarian oxidative metabolism, and the participation of Ang II as a possible modulator of the formation of reactive oxygen species in ovaries of obese rats and their effects on ovulation. Female rats fed a diet consisting of high calorie foods palatable, known as cafeteria diet from weaning to adulthood, for a period of 17 weeks. The animals were divided into groups: Control (CTL) CTL LOS (control + losartan), CAF (cafeteria) and CAF LOS (losartan + cafeteria). We evaluate the consumption of food and fluids, body weight, abdominal and retroperitoneal fat weight, the plasma insulin concentration, the number of oocytes, the activities of antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase), concentration of hydrogen peroxide (H_2O_2) and parameters of oxidative damage (lipid peroxidation and protein oxidation). The females of the CAF group had higher energy consumption and reduced consumption of water and standard chow, hyperinsulinemia, increased abdominal and retroperitoneal fat, and weight gain. Obesity not significantly reduced ovulation, but increased the activity of antioxidant enzymes and the concentration of H_2O_2 in the ovary. The administration of losartan in rats fed the cafeteria diet, reduced total energy intake, plasma insulin concentration and abdominal fat gain, but did not prevent the development of obesity. Losartan inhibited the activity of the antioxidant enzyme superoxide dismutase in the ovary of rats CAF group, but did not alter the activity of the catalase antioxidant enzyme. The results of this study demonstrate that the cafeteria diet results in changes in metabolism and suggests the involvement of Ang II in the formation of ROS in the ovary.

Keywords: obesity, renin-angiotensin system, angiotensin II, ovulation, reactive oxygen species.

ABREVIATURAS

AGT - Angiotensinogênio

Ang I - Angiotensina I

Ang II - Angiotensina II

AP - Área postrema

AT1 - Receptor do tipo 1 de angiotensina II

AT2 - Receptor do tipo 2 de angiotensina II

CAF - Grupo cafeteria

CAF LOS - Grupo cafeteria losartan

CAT - Catalase

CTL - Grupo controle

CTL LOS - Grupo controle losartan

ECA - Enzima conversora de Ang I

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

ET-1 - Endotelina 1

FSH - hormônio folículo estimulante

GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofinas

GPx - Glutaciona peroxidase

ICV - Intra cérebro ventricular

LH - Hormônio Luteinizante

MNPO - Núcleo mediano pré-óptico

α -MSH - alfa hormônio estimulante de melanócitos

NADPH oxidase - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato-oxidase

NYP - Neuropeptídeo Y

OCVS - Órgãos circunventriculares

OSF - Órgão subfornicial

OVLT - Órgão vasculoso da lâmina terminal

PBN - Núcleo parabraquial pontino

PCO - Síndrome do ovário policístico

PKC - Proteína quinase C

PNA - Peptídeo natriurético atrial

PVN - Núcleo paraventricular

SHBG - Globulina ligadora de esteróide

SOD - Superóxido Dismutase

SRA - Sistema Renina-Angiotensina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Geração de ERO durante a ovulação e esteroidogênese no corpo lúteo.....	21
Figura 2: Equilíbrio entre ERO e antioxidantes no folículo.....	22
Figura 3. Ingestão energética total por animal/dia na 17 ^a semana.....	35
Figura 4. Ingestão energética de sólidos por animal/dia na 17 ^a semana.....	36
Figura 5. Ingestão em gramas de ração padrão por animal/dia na 17 ^a semana.....	37
Figura 6. Ingestão líquida total por animal/dia na 17 ^a semana.....	38
Figura 7. Ingestão de água por animal/dia na 17 ^a semana.....	39
Figura 8. Ingestão de refrigerante por animal/dia na 17 ^a semana.....	40
Figura 9. Ingestão de sódio (mg) por animal/dia (A), Ingestão de carboidratos (g) por animal/dia (B), Ingestão de proteínas (g) por animal/dia (C) e Ingestão de lipídeos (g) por animal/dia (D) na 17 ^a semana.....	42
Figura 10. Evolução da ingestão de água por animal/dia na 17 ^a semana.....	43
Figura 11. Concentração da insulina plasmática, avaliada após 17 semanas.....	44
Figura 12. Contagem do número de oócitos na manhã do estro em ratas adultas.....	45
Figura 13. Peso ovariano (A) e Peso ovariano dividido por peso corporal x 10 ³ (B).....	46
Figura 14. Peso das gorduras abdominal (A) e retroperitoneal (B) após 17 semanas de ingestão da dieta de cafeteria em associação com a administração de losartan.....	47
Figura 15. Atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) medida na manhã do estro no ovário de ratas adultas.....	48
Figura 16. Medida da atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) na manhã do estro no ovário de ratas adultas.....	49
Figura 17. Concentração de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) no ovário de ratas na manhã do estro.....	50
Figura 18. Medida dos níveis de lipoperoxidação no ovário, na manhã do estro, em ratas adultas.....	51
Figura 19. Medida da oxidação de proteínas por meio da medida de carbonilas (nmol/ mg proteína) plasmáticas, avaliado na manhã do estro em ratas.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos alimentares ofertados em dias alternados.....	29
Tabela 2: Medida do ganho de peso corporal (em gramas) dos grupos experimentais.....	45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 OBESIDADE E FUNÇÃO REPRODUTIVA	10
1.2 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA	12
1.3 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E OBESIDADE	13
1.4 ANGIOTENSINA II E REPRODUÇÃO EM FÊMEAS	16
1.5 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO	18
1.6 REPRODUÇÃO E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	20
1.7 OBESIDADE E ESTRESSE OXIDATIVO	23
2. JUSTIFICATIVA	24
3. HIPÓTESE	25
4. OBJETIVOS	26
4.1 OBJETIVO GERAL	26
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
5 METODOLOGIA	27
5.1 ANIMAIS	27
5.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS	27
5.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	28
5.3.1 <i>Pesagem dos Animais</i>	28
5.3.2 <i>Método de avaliação da ingestão alimentar e hídrica</i>	28
5.3.3 <i>Dieta de Cafeteria e Dieta Padrão</i>	29
5.3.4 <i>Administração oral do losartan</i>	30
5.3.5 <i>Determinação do Ciclo Estral</i>	30
5.3.6 <i>Obtenção e preparo da amostra para: LPO, concentração de H₂O₂ e atividade enzimática</i>	30
5.3.7 <i>Coleta de sangue para dosagem de insulina</i>	31
5.4 CONTAGEM DO NÚMERO DE OÓCITOS	31
5.5 MEDIDAS DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTE	31
5.5.1 <i>Superóxido Dismutase (SOD)</i>	31
5.5.2 <i>Catalase (CAT)</i>	32
5.5.3 <i>Dosagem de proteínas</i>	32
5.6 CONCENTRAÇÕES DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H ₂ O ₂)	33
5.7 MARCADORES DE DANO OXIDATIVO	33
5.7.1 <i>Quimiluminescência</i>	33
5.7.2 <i>Medida dos níveis de proteínas oxidadas: ensaio das carbonilas oxidadas</i>	34
5.8 ESTATÍSTICA	34
6. RESULTADOS	35
6.1. EXPERIMENTO 1: EFEITO DA DIETA DE CAFETERIA ASSOCIADA A ADMINISTRAÇÃO DE LOSARTAN, INTRODUZIDOS A PARTIR DO DESMAME, SOBRE A OVULAÇÃO, A INGESTÃO ALIMENTAR E HÍDRICA.	35

6.2. EXPERIMENTO 2: EFEITO DA DIETA DE CAFETERIA ASSOCIADA A ADMINISTRAÇÃO DE LOSARTAN, INTRODUZIDOS A PARTIR DO DESMAME, SOBRE PARÂMETROS OXIDATIVOS MEDIDOS NA MANHÃ DO ESTRO NO OVÁRIO DE RATAS.	45
7. DISCUSSÃO.....	53
8.CONCLUSÕES.....	70
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

1. INTRODUÇÃO

1.1 OBESIDADE E FUNÇÃO REPRODUTIVA

A função reprodutiva em fêmeas de mamíferos é regulada de forma precisa por uma sequência de eventos hormonais envolvendo fatores centrais e periféricos. O sistema de liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) é o controlador central de grande importância para os eventos reprodutivos. O evento mais importante do ciclo reprodutivo de fêmeas é a ovulação, por permitir a perpetuação da espécie. Ao decorrer de cada ciclo ovariano ocorre a sincronia entre inibição e ativação da síntese e liberação hipotalâmica de GnRH, o que ocasionará um aumento agudo da secreção de gonadotrofinas, resultando na indução da ovulação. Os neurônios de GnRH se encontram distribuídos diferentemente em várias regiões hipotalâmicas e extra-hipotalâmicas. Em ratas, estes se concentram principalmente, na área pré-óptica. Em todos os mamíferos após a puberdade a secreção do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) ocorrem em um ritmo pulsátil, e é a secreção também pulsátil de GnRH que determinará o padrão rítmico de liberação de gonadotrofinas. O mecanismo gerador de pulsos parece ser modulado por contatos sinápticos com neurotransmissores e neuromoduladores intra e extra-hipotalâmicos.

Existe uma interação entre o eixo reprodutivo e o eixo que controla a ingestão de alimentos, por meio da ação de hormônios como a insulina, leptina e grelina, incluindo interações com neuropeptídeos que também estão envolvidos no funcionamento de ambos os eixos (Schneider, 2004). Atuando de forma coordenada, esses compostos fornecem meios para o sistema reprodutor responder de acordo com a disposição de combustíveis metabólicos (Evans & Anderson, 2012). O peso corporal é extremamente importante para iniciar e manter a função reprodutiva, conforme a observação de que crianças desnutridas não entram em puberdade e que crianças obesas iniciam a puberdade precocemente (Lordelo *et al.*, 2007), indicando existir interação entre os dois eixos.

Muitos neurônios, que de maneira direta ou indireta, interagem com neurônios de GnRH (os controladores centrais do eixo reprodutivo) são influenciados por componentes envolvidos no controle do apetite, como a galanina, o alfa hormônio estimulante de melanócitos (α -MSH), neuropeptídeo Y (NYP) e a ocitocina. Estes por sua vez podem ser

estimulados ou inibidos por hormônios secretados por tecidos periféricos em proporção ao estado metabólico (Evans & Anderson, 2012).

A obesidade é uma desordem nutricional caracterizada pelo desequilíbrio entre o consumo e o gasto de energia. Representa um fator de risco para o desenvolvimento de doenças relacionadas que diminuem a qualidade e a expectativa de vida (Hill & Peters, 1998). A prevalência e a gravidade da obesidade têm aumentado nos últimos anos, provavelmente como resultado de complexas interações entre genes, dieta, atividade física e ambiente. Os fatores mais importantes para a epidemia da obesidade são as oportunidades atuais para o consumo e gasto energéticos (Biro & Wien, 2010).

O excesso de peso corporal é prejudicial à reprodução e a associação entre obesidade e infertilidade em mulheres tem sido reconhecida em vários estudos (Pasquali et al., 2003, 2007). Existe uma relação entre o excesso de peso corporal e os distúrbios reprodutivos na obesidade, particularmente durante a adolescência (Pasquali et al., 2007). As consequências da obesidade na infância e na adolescência incluem puberdade precoce e menarca, diabetes tipo II, aumento da incidência de síndrome metabólica em jovens e adultos, e obesidade na vida adulta (Biro & Wien, 210).

A fertilidade envolve complexos fatores e mecanismos de origem ovariana e extra-ovariana, e a obesidade pode interferir com muitas funções neuroendócrinas e ovarianas, reduzindo tanto a ovulação quanto a fertilidade. O aumento de peso e da gordura corporal está associado com várias anormalidades no balanço dos esteróides sexuais. Tais alterações envolvem andrógenos e estrógenos e sua proteína carreadora, a globulina de ligação aos esteróides sexuais (SHBG) (Pasquali et al., 2006).

Durante a adolescência, há uma mudança no acúmulo e distribuição de gordura corporal, incluindo um aumento da adiposidade abdominal, que está intimamente associada a redução da sensibilidade do músculo e do tecido adiposo à insulina, de forma compensatória ocorre aumento na secreção de insulina. Essa elevação, fisiológica, resulta em redução na circulação de SHBG, com consequente liberação dos hormônios estrogênicos e andrógenos bioativos, amplificando os efeitos destes e facilitando a maturação sexual (Sharpe & Franks, 2002).

O hormônio insulina é produzido pelas células beta das ilhotas pancreáticas e secretado na circulação com a principal função de diminuir as concentrações plasmáticas de glicose. Em adição sugere-se que esse hormônio seja capaz de informar ao sistema nervoso central sobre a quantidade de energia estocada na forma de tecido adiposo ao atravessar a barreira hemato-encefálica por meio de receptores localizados nas células endoteliais de

capilares encefálicos (Shwartz, 2000). Outra função atribuída a esse hormônio seria participar no controle de processos reprodutivos (Gamba & Pralong, 2006; Salvi et al., 2006).

Os trabalhos de Pou e colaboradores (2007) e Tilg e Moshen (2008) mostram que as alterações metabólicas relacionadas com a obesidade são associadas a uma resposta inflamatória crônica, caracterizada por uma produção anormal de citocinas, ocasionando ativação da inflamação no tecido adiposo. Portanto, o excesso de adiposidade pode estar associado com inflamação sistêmica. A obesidade, particularmente o fenótipo abdominal, está associada com vários distúrbios reprodutivos em mulheres, podendo ocorrer de diferentes maneiras, afetando a ovulação, os processos fisiológicos e o curso da gestação como demonstrado por Pasquali e colaboradores (2003, 2007) e por Nelson e Fleming (2007).

A obesidade é caracterizada pelo aumento das reservas de ácidos graxos e expansão da massa de tecido adiposo, ao qual tem sido atribuído um papel endócrino devido à descoberta de produtos derivados dos adipócitos, como a leptina, adiponectina, citocinas inflamatórias (Galica et al., 2010) e a angiotensina II (Ang II) um componente do sistema renina-angiotensina (SRA) (Engeli et al., 2000). Adicionalmente, alterações na produção dos componentes do SRA pelos adipócitos podem contribuir para o desenvolvimento da obesidade (Engeli et al., 2003), já tendo sido demonstrado em humanos e camundongos obesos um acréscimo substancial da secreção de angiotensinogênio (AGT) derivado do tecido adiposo, esse aumento correlaciona-se com os níveis de AGT plasmáticos, sugerindo que o tecido adiposo pode participar da regulação do conteúdo de AGT na obesidade (Yasue et al., 2010).

1.2 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

O sistema renina-angiotensina (SRA) é formado pelos componentes primários renina (a enzima que catalisa a conversão do substrato angiotensinogênio para angiotensina I – Ang I), o angiotensinogênio, a enzima conversora de Ang I (ECA), angiotensina II (produto da ação catalítica da ECA sobre o peptídeo Ang I) e os receptores de angiotensina responsáveis pela iniciação dos efeitos celulares desencadeados pela ligação deste peptídeo (Fitzsimons, 1980). O octapeptídeo Ang II é conhecido como o efector circulante fisiologicamente ativo do SRA, e está envolvido no controle sistêmico da pressão sanguínea e na manutenção do equilíbrio hidroeletrolítico (Saavareda, 1992). A angiotensina II (Ang II) exerce seus principais efeitos por meio de dois subtipos de receptores (Chiu et al., 1989; Whitebread et al.,

1989; Batenburg et al., 2004), classificados com base nas suas propriedades farmacológicas e bioquímicas, esses dois subtipos são designados como receptores da angiotensina II tipo 1 (AT₁) e tipo 2 (AT₂) (Timmermans et al., 1993; Jöhren et al., 1997). Os receptores AT₁ são seletivamente bloqueados por bifenilimidazoles como o losartan, enquanto os receptores AT₂ são bloqueados pelas tetrahydroimidazopiridinas como o PD123.177 e PD 123.319 (Bumpus et al., 1991).

O SRA é considerado como um sistema endócrino na definição clássica. No entanto, outras ações do SRA na mediação de funções fisiológicas têm sido identificadas, assim como a presença dos componentes desse sistema em diferentes locais, levando ao estabelecimento do novo conceito de um sistema local ou tecidual (Gonzálvez et al., 2012). Além do SRA clássico, demonstrou-se a existência de um SRA central (Lenkei et al., 1997), atuando no controle da secreção de hormônios envolvidos com processos reprodutivos (Pan, 2004); a presença do SRA em sítios específicos como no tecido adiposo (Engeli et al., 2000) e no ovário (Daud et al., 1988).

1.3 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E OBESIDADE

O tecido adiposo de roedores, como em humanos, contém todos os componentes do SRA (Engeli et al., 2000), incluindo angiotensinogênio (Cassis et al., 1998) e a enzima conversora de Ang I (Shenoy & Cassis, 1997). Estudos demonstraram que a alteração na produção dos componentes do SRA pelos adipócitos pode contribuir para o desenvolvimento da obesidade (Engeli et al., 2003). Em obesos humanos e em modelos animais os componentes do SRA encontram-se elevados no tecido adiposo e na circulação (Engeli et al., 2005); indicando que o angiotensinogênio derivado do tecido adiposo contribui, significativamente, para o aumento da angiotensina circulante (Boustany et al., 2004). O grau de obesidade e a concentração plasmática de angiotensinogênio se correlacionam, positivamente, em seres humanos e em modelo animais (Giacchette et al., 2002). A expressão dos componentes do SRA no tecido adiposo é regulada pela Ang II, mas este peptídeo também estaria envolvido na regulação do crescimento e diferenciação dos adipócitos, no metabolismo lipídico, na liberação de adipocinas e no desencadeamento de estresse oxidativo (Cassis et al., 2008).

Mediante a transdução de sinal do receptor AT₁ da Ang II é induzido a secreção de prostaglandinas que participam da diferenciação celular dos pré-adipócitos. A Ang II

estimula a diferenciação dos adipócitos e a lipogênese no momento da conversão da Ang I em II, indicando a participação das mesmas no processo de acúmulo de gordura corporal (Cooper et al., 1997; Giacchetti et al., 2002). Sugere-se que a regulação e a função do SRA sobre o desenvolvimento do tecido adiposo ocorra nas condições em que a adiposidade visceral está presente (Safanova et al., 1997), pois se constatou que humanos obesos normotensos possuem um aumento da expressão do receptor AT1 e de angiotensinogênio no tecido adiposo visceral em comparação a outros depósitos de gordura corporal (Giacchetti et al., 2002).

Ambos receptores, AT1 e AT2 podem ter efeitos sinérgicos e aditivos para promover o armazenamento de lipídeos em resposta aos nutrientes do ambiente. Tem sido demonstrado que esses receptores, ao mediar os efeitos da Ang II, podem modular a expansão da massa gorda, o que ocorreria através da regulação da lipogênese via AT2 e “down regulation” da lipólise via AT1, no tecido adiposo (Yvan-Charvet & Quinard-Boulangé, 2011). Desta forma a Ang II regula síntese e armazenamento de lipídeos, contribuindo para a adiposidade (Safanova et al., 1997; Strazzullo et al., 2004), aumentando o conteúdo de triglicérides e alterando a atividade de enzimas lipogênicas (Strazzullo et al., 2004).

Sugere-se que o receptor AT2 participe no início da diferenciação dos adipócitos, pois quando os adipócitos estão maduros a ativação do AT2 restaura a morfologia normal dos adipócitos e melhora a sensibilidade à insulina, e o uso concomitante de agonista do AT2 (PD123.319) e do antagonista do AT1 (losartan) reduz a hiperinsulinemia desencadeada por dieta rica em gordura e frutose (Safanova et al., 1997).

Na obesidade, a produção local da Ang II conduz à formação de citocinas inflamatórias (Engeli et al., 2003), dessa forma a Ang II pode atuar em respostas inflamatórias, além de estimular várias vias de sinalização que levam ao crescimento celular (Griendling & Fukai, 2000). O aumento da produção de angiotensinogênio no tecido adiposo pode ser um dos fatores responsáveis pelas alterações inflamatórias associadas com a obesidade, pois este tecido expressa o SRA necessário para produção local de Ang (Yvan-Charvet & Quinard-Boulangé, 2011). Além da formação de citocinas inflamatórias, a Ang II pode induzir um aumento de estresse oxidativo e dessa forma desencadear a inflamação (Tomono et al., 2008).

O bloqueio do AT1 em roedores com obesidade genética ou induzida por dieta diminui a formação de citocinas inflamatórias e de ERO provenientes do tecido adiposo (Kurata et al., 2006). Reduzindo a expressão de citocinas e dos marcadores de estresse oxidativo em modelo animal de aterosclerose e diabetes (Tomono et al., 2008). Neste

contexto o uso de antagonistas do receptor AT1 poderia proteger contra a inflamação decorrente do desenvolvimento da obesidade.

Em modelos animais com obesidade induzida por dieta, a deleção dos componentes do SRA possui efeito protetor contra o desenvolvimento de obesidade e os distúrbios metabólicos, sugerindo o envolvimento do SRA na regulação da expansão do tecido adiposo (Massiera et al., 2001). O uso de antagonistas do receptor AT1 também apresentam implicações sobre o peso corporal. A administração de losartan (antagonista do receptor AT1 da Ang II) reduz o peso do tecido adiposo e o tamanho dos adipócitos em camundongos diabéticos (Tomono et al., 2008); e a deficiência genética do receptor AT1 para angiotensina II promove atenuação do ganho de peso corporal e adiposidade (Kouyama et al., 2005).

As células vasculares produzem espécies reativas de oxigênio (ERO), principalmente, por meio do complexo enzimático NADPH oxidase presente em suas membranas; as ERO podem influenciar a função dos vasos por modularem o tônus, o crescimento celular e a inflamação, entre outros eventos (Touyz et al., 2005). A Ang II influencia a função de vários tipos celulares e regula vários sistemas de órgãos, este efeito se deve, em grande parte, a processos redox-sensíveis, em que as ERO são reconhecidas como moléculas de sinalização atuantes nas vias ativadas por Ang II (Nguyen et al., 2013).

A ativação do SRA em órgãos periféricos contribui para o desenvolvimento da obesidade e da síndrome metabólica (Prasad, 2004), assim como da diabetes e da hipertensão. No entanto, o envolvimento desse sistema com o comportamento alimentar não está claro, mas parece envolver a via de sinalização da Ang II no receptor AT1 localizado no hipotálamo e sua regulação sobre o neurocircuito envolvido na ingestão de alimentos (Yamamoto et al., 2011). No cérebro, o SRA é um importante regulador da pressão sanguínea e do consumo de líquidos, mas também pode atuar na regulação do metabolismo. No SRA central, as vias eferentes que regulam a pressão arterial e o efeito dipsogênico parecem ser distintas da regulação dos efeitos metabólicos, sendo os primeiros dependentes do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, o qual por sua vez depende da interação entre o SRA central e o SRA sistêmico (ou adiposo) (Sigmund et al., 2012). Em ratos adultos, a Ang II central atua afetando a ingestão de alimentos e o consumo de energia de forma não relacionada ao consumo de água (Porter & Potratz, 2004).

1.4 ANGIOTENSINA II E REPRODUÇÃO EM FÊMEAS

A função ovariana em fêmeas de mamíferos é principalmente coordenada por fatores endócrinos, principalmente gonadotrofinas (hormônio folículo estimulante - FSH e hormônio luteinizante - LH) e seus receptores, e por esteroides ovarianos. Está bem estabelecido que o crescimento do folículo ocorra de maneira cíclica e o desenvolvimento dos folículos é estimulado por aumento transitório do FSH. Entre os fatores autócrinos e parácrinos, que se sabe estarem envolvidos na regulação do desenvolvimento folicular até o final da fase folicular e atuarem nos eventos que levarão a ovulação, encontram-se os peptídeos do SRA, especialmente a Ang II (Ferreira et al., 2007).

Em diferentes espécies, já foi demonstrado que o ovário contém todos os componentes do SRA (Husain et al., 1987; Daud et al., 1988). No ovário de ratas, a presença dos componentes do SRA foi evidenciada no estroma ovariano, em folículos principalmente atrésicos e, em menor medida, no corpo lúteo (de Gooyer et al., 2004). O peptídeo Ang II está entre os vários fatores que interagem na dinâmica folicular, como hormônios e seus receptores (Yoshimura, 1997). A Ang II local está envolvida na modulação da atresia folicular, esteroidogênese, ovulação, maturação dos oócitos, formação do corpo lúteo e angiogênese (Yoshimura, 1997).

Husain e colaboradores (1987) confirmaram a presença de receptores em ovários de ratas, bem como do octapeptídeo Ang II, independente do SRA renal, o que sugere a Ang II como um regulador autócrino ou parácrino da função ovariana. Os receptores foram encontrados em folículos, ocorrendo nas células da granulosa e nas células da teca interna. Deve-se salientar que as ações da Ang II, bem como a distribuição e densidade de receptores do SRA ovariano variam entre as espécies (de Gooyer et al., 2004). Ambos receptores foram encontrados em ovários de ratas, mas com diferentes localizações, o receptor AT2 predomina nas células da granulosa de folículos atrésicos (Obermuller et al., 1998; 2004).

Em um estudo realizado por Mikuni e colaboradores (1998) em ovários de ratas perfundidos “in vitro”, o uso de saralasin (antagonista não peptídico análogo da angiotensina) ocasionou diminuição do número de ovulações. No entanto, o bloqueio apenas do receptor AT2 com o antagonista PD123.319 não reproduz o mesmo efeito. Todavia, em ovários de coelhas perfundidos “in vitro”, a inibição do receptor AT2 com PD123.319 afeta a ovulação de maneira dose-dependente (Yoshimura, 1996). Com o bloqueio do receptor AT1, em ovários perfundidos de ratas, o número de ovulações não é afetado, já a combinação losartan (antagonista do receptor AT1) e PD123.319 a ovulação é inibida, no entanto o uso

isolado de PD123.319 não bloqueia a ovulação apenas a diminuir (Mitsube et al., 2003). Estes resultados indicam que o processo de ovulação é mediado via receptores AT1 e AT2 de forma cooperativa.

Em mulheres com ciclos regulares, a estimulação máxima do sistema renina-angiotensina nos folículos ovarianos é alcançada no período pré-ovulatório, mediante um aumento intrafolicular da atividade da renina, o que desencadeia o aumento nas concentrações de Ang II nos folículos pré-ovulatórios em resposta ao aumento de LH (Lightman et al., 1987). A indução de Ang II pelo LH exerce um importante papel na ovulação e na maturação de oócitos (Yoshimura et al., 1992) e parece regular a ovulação através do estímulo da síntese de prostaglandinas (Peterson et al., 1993; Yoshimura et al., 1993). Outros estudos, avaliando a retomada da meiose em oócitos de bovinos, confirmaram a participação das prostaglandinas como mediadoras das funções da Ang II no período pré-ovulatório (Barreta et al., 2008).

No ovário, ocorrem alterações hemodinâmicas que atuam no remodelamento cíclico do tecido ovariano, durante os eventos de crescimento folicular, ovulação, formação do corpo lúteo e sua regressão, estas mudanças locais de fluxo sanguíneo estão relacionadas a alterações na biossíntese de prostaglandinas (Acosta et al., 2002). As prostaglandinas, juntamente com os leucotrienos, a bradicinina e a histamina, induzem o processo de ruptura da parede do folículo e a extrusão do oócito maduro na ovulação (Espey, 1992). O peptídeo Ang II é capaz de estimular a síntese de prostaglandinas por meio do receptor AT1 (Giacchetti et al., 2002), esse peptídeo modula o tônus vascular na circulação sistêmica, mas também parece regular fenômenos reprodutivos a exemplo da ovulação (Pellicer et al., 1988).

Os peptídeos Ang II, endotelina-1 (ET-1) e peptídeo natriurético atrial (PNA) têm a capacidade de induzir mudanças locais nos vasos de diferentes órgãos e tecidos, seus efeitos provavelmente são relacionados ao controle do fluxo sanguíneo folicular, agindo em uma mesma cascata de reação local, o que poderia mediar a ação do LH e acelerar a produção de prostaglandinas durante o período pré-ovulatório (Acosta & Miyamoto, 2004).

Além da produção de prostaglandinas, o aumento ovulatório dos níveis de LH resulta em inflamação folicular, com aumento de citocinas, e ERO. A geração de ERO durante o processo da cascata ovulatória, em folículos pré-ovulatórios de ratas, parece ser mediada pela NADPH oxidase, já que o uso de inibidores suprime a produção dessas espécies, indicando a presença de um gerador de ânion superóxido nos folículos pré-ovulatórios, regulados por hormônios (Kodman & Behrman, 2001).

Estudos mostram que a produção de ERO está entre os mecanismos de sinalização da Ang II, estas espécies estão envolvidas na transdução de sinal. A Ang II estimula a enzima NADPH oxidase produzindo $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , os quais podem atuar em proteínas intracelulares relacionadas ao crescimento e agirem sobre a ação de enzimas, mediando a resposta fisiológica final da Ang II. Importantes funções fisiológicas da Ang II são diretamente mediadas por ERO, incluindo indução da resposta inflamatória vascular, crescimento da musculatura lisa e relaxamento do endotélio (Griendling & Ushio-Fukai, 2000). Possivelmente no ovário a Ang II também possa modular a formação de ERO, sendo, portanto, uma das fontes dessas espécies.

1.5 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO

Conceitualmente, os radicais livres são espécies químicas que possuem elétrons desemparelhados em seu orbital externo. Característica que confere a essas espécies um considerável grau de reatividade, pois possuem a tendência em adquirir um segundo elétron para o seu orbital (Halliwell, 2006). Os radicais livres são átomos ou moléculas produzidas continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes no metabolismo. As principais fontes de radicais livres são as organelas citoplasmáticas que metabolizam o oxigênio, o nitrogênio e o cloro, gerando grande quantidade de metabólitos (Shami & Moreira, 2004).

Durante o metabolismo celular ocorre a geração de radicais livres de oxigênio ou, o termo mais generalista, espécies reativas de oxigênio (ERO), incluindo: radical hidroxil (OH^{\cdot}), ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2). É reconhecido um papel duplo dessas espécies, uma vez que seus efeitos nos organismos vivos podem ser benéficos ou deletérios, dependendo da concentração em que ocorram e de suas funções fisiológicas (Valko et al., 2007).

A manutenção das funções celulares depende de uma produção de ERO em um nível basal (Stone & Yang, 2006). Quando em altas concentrações, estas espécies podem mediar danos às estruturas celulares, ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas (Valko et al., 2006). Para manter a homeostasia existem mecanismos de defesa conhecidos como antioxidantes, que podem ser enzimáticas ou não enzimáticas. Os componentes do sistema de defesa antioxidante enzimático incluem, entre outros, a enzima superóxido dismutase (SOD), a glutatona peroxidase (GPX) e a catalase (CAT), e os componentes não enzimáticos, como o

alfa-tocoferol (vitamina E), beta-caroteno, ascorbato (vitamina C) e a glutathione (Droge, 2002; Halliwell, 2009; Halliwell & Gutteridge 2010).

O radical $O_2^{\cdot-}$ é produzido durante a redução do oxigênio molecular e considerado uma espécie primária, quando em excesso pode ser um precursor de outras ERO secundárias. O radical $O_2^{\cdot-}$ pode sofrer dismutação espontânea ou através da ação da enzima SOD formando H_2O_2 , que ao reagir com metais de transição como o ferro ou cobre pode resultar na formação do radical OH^{\cdot} , que é altamente reativo (Halliwell & Gutteridge, 2000). A formação do radical OH^{\cdot} requer a presença de átomo de ferro, reagindo primeiramente com o $O_2^{\cdot-}$ para tornar-se reduzido, e então com H_2O_2 para formar o radical OH^{\cdot} . Sequestradores tanto de superóxido $O_2^{\cdot-}$ como peróxido de hidrogênio H_2O_2 , tais como SOD, podem efetivamente inibir esta reação (Pacher et al., 2007).

O radical OH^{\cdot} é altamente reativo, logo pode reagir com cada molécula biológica dentro de uma distância de difusão muito curta, difunde-se em média menos que o diâmetro de uma proteína típica. Sua relevância biológica é limitada porque é formado por uma reação lenta, e ao ser formado, visto sua alta reatividade, reage com qualquer alvo biológico próximo ao seu local de formação (Pacher et al., 2007).

O peróxido de hidrogênio H_2O_2 produzido na mitocôndria possui uma ação oxidante fraca, quando comparado com as demais espécies reativas de oxigênio (ERO). No entanto, sua capacidade de difusão através da membrana celular permite que alcance outros compartimentos celulares como o núcleo (Halliwell & Gutteridge, 2000).

Embora a maioria dos radicais livres possua uma vida extremamente curta, eles facilmente captam elétrons de outras moléculas, dessa forma iniciam uma reação em cadeia gerando mais radicais, o que resulta em lesões oxidativas no DNA e oxidação dos lipídeos poliinsaturados nas células ocasionando ruptura das membranas biológicas. Sendo a mitocôndria o principal sítio de formação de radicais livres nas células, seus lipídeos, seu DNA e suas proteínas são mais atingidas (Voet, Voet & Pratt, 2000).

Em um processo de geração em cadeia pode ocorrer amplificação do dano oxidativo, através de um conjunto de reações oxidativas de lipídeos insaturados. Denomina-se esse processo de peroxidação lipídica (Halliwell & Gutteridge, 2000). A lipoperoxidação ou peroxidação lipídica é representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação (Halliwell & Gutteridge, 1999).

A manutenção da homeostasia do ambiente celular resulta da complexa interação entre a produção e metabolismo de moléculas oxidantes, quando o ambiente é modificado para níveis mais elevados das mesmas, o excesso de moléculas oxidantes pode sobrecarregar os

sistemas de defesa antioxidante resultando em estresse oxidativo. Isso ocorre devido a um excesso de produção de ERO ou uma redução na sua remoção por parte dos mecanismos de defesa (Agarwal et al., 2005a). Condições patológicas podem desenvolver, em casos mais extremos, alta persistência dos níveis de espécies reativas. Esta condição não envolve necessariamente a perda da homeostasia, mas uma mudança crônica no nível de homeostasia (Droge, 2002).

1.6 REPRODUÇÃO E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

A ovulação é precedida por eventos com características de uma resposta inflamatória, que ocorre mediante o aumento pré-ovulatório de LH, resultando em hiperemia folicular, edema, vasodilatação e presença de mediadores inflamatórios, como o extravasamento de leucócitos que representa um importante evento para o processo de ruptura folicular (Espey, 1980). Sabe-se que entre as funções fisiológicas dos radicais livres inclui a mediação de respostas inflamatórias, atuando em vias de sinalização (Valko, 2007), e relata-se o envolvimento das ERO na ovulação (Argawal et al., 2005b), pois este evento apresenta características inflamatórias. Macrófagos, neutrófilos e células endoteliais vasculares residem nos folículos ovarianos e podem gerar ERO durante a ovulação (Argawal et al., 2008).

Estudos apontam para o envolvimento das ERO durante os processos metabólicos do ovário (Shinamura et al., 1995), como o desenvolvimento do ovócito, a maturação, a atresia folicular, o funcionamento do corpo lúteo e a luteólise (Agarwal et al., 2005a). Experimentalmente já foi demonstrado “in vitro” por Miyazaki e colaboradores (1991) que a administração das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) bloqueiam a ovulação, inibindo a ruptura folicular em ovários de coelhas. Isto indica que a geração do radical $O_2^{\cdot-}$, ou espécies secundárias a esse radical, é parte de um processo fisiológico durante os eventos pré-ovulatórios, sendo essencial para a ruptura folicular a participação de ERO.

A produção ovariana de ERO é um evento de sinalização indispensável à ovulação, e provavelmente é desencadeada pelo aumento agudo pré-ovulatório de LH, cujo efeito estimula a “up-regulation” de genes essenciais à ovulação, no entanto a resposta é inibida por antioxidantes mesmo em presença de LH (Shkonilk et al., 2011), confirmando a importância fisiológica das ERO no tecido ovariano.

Uzuelli (2006) (não publicado) demonstrou que durante a ruptura folicular ocorre a produção local de ERO, um indicativo da participação dessas espécies no processo ovulatório,

resultando em aumento da peroxidação lipídica no ovário de ratas nas fases do pró-estro e estro, o que poderia ser compreendido como uma alteração decorrente do processo de ruptura folicular, porque o dano oxidativo em lipídeos promove aumento da permeabilidade das membranas celulares, facilitando o rompimento do folículo.

Em folículos pré-ovulatórios de ratas a produção do radical $O_2^{\cdot-}$ ocorre por uma via mediada por Proteína cinase C (PKC), regulada por hormônios. Nas células da granulosa, isoladas dos folículos, a enzima NADPH oxidase parece ser uma fonte geradora do radical $O_2^{\cdot-}$, visto que a inibição do complexo enzimático diminui a produção de ERO nestas células (Kodaman & Behrman, 2001). As ERO participam do processo que antecede a ruptura folicular, mas após a ovulação outra forma de geração destas espécies ocorreria por ação do corpo lúteo, via reação das monooxigenases, como um produto durante a síntese de hormônios esteróides (Fujii et al., 2005), participando da luteinização (figura 1).

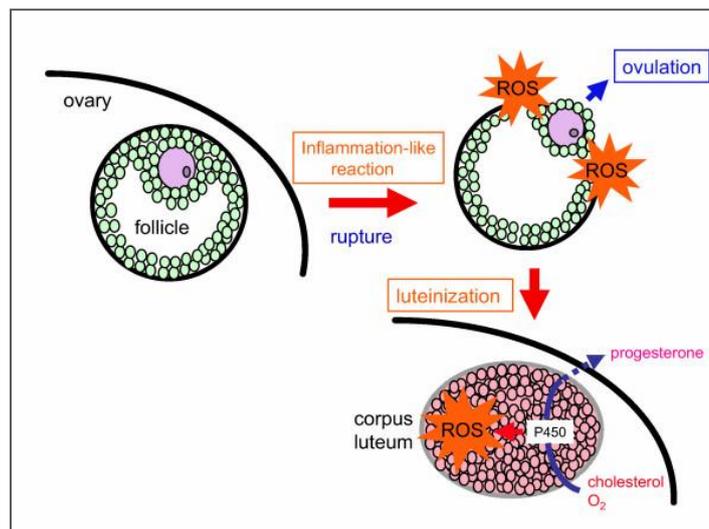


Figura 1: Geração de ERO durante a ovulação e esteroidogênese no corpo lúteo (Fujii et al., 2005).

Apesar das ERO desempenharem um papel fundamental na ruptura folicular durante a ovulação (Kodaman & Behrman, 2001; Fujii et al., 2005; Shkolnik et al., 2011), podem potencialmente ocasionar danos ao oócito e às células da granulosa (durante a luteinização), o mecanismo não é claro, mas parece que fêmeas inférteis possuem diminuição das defesas antioxidantes (Tamura et al., 2013). A maturação do oócito e a função das células da granulosa dependem de um equilíbrio crítico entre ERO e antioxidantes, portanto é provável que modificações no equilíbrio redox alterem a qualidade dos oócitos, podendo ser um importante fator de infertilidade feminina (figura 2) (Tamura et al., 2013).

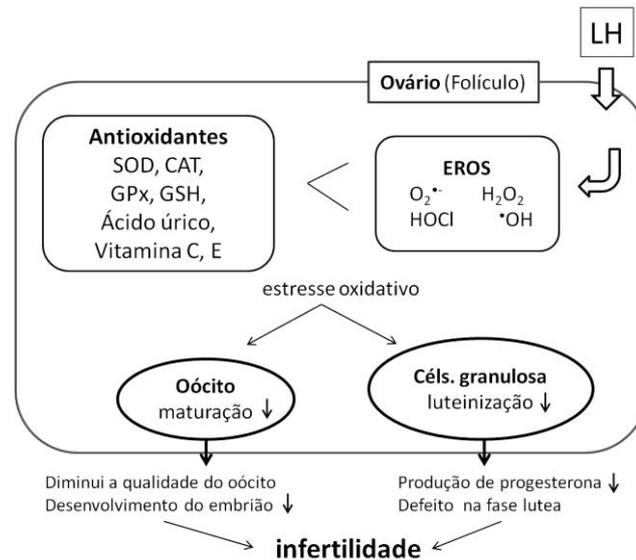


Figura 2: Equilíbrio entre ERO e antioxidantes no folículo.

ERO são produzidas dentro dos folículos, especialmente no processo de ovulação induzido pelo aumento agudo de LH (pré-ovulatório). Defesa antioxidante enzimática a superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT), e não enzimática, como a vitamina E, vitamina C, glutathiona e ácido úrico, estão presentes nos folículos. Quando em excessos, as ERO podem estar envolvidas no estresse oxidativo de oócitos e células da granulosa. A manutenção do equilíbrio entre EROs e antioxidantes dentro do folículo pode ser crítica para a maturação do oócito e a luteinização das células da granulosa (adaptado de Tamura et al., 2013).

Estudos indicam que ERO e antioxidantes modulam a proliferação de vários tecidos em condições fisiológicas e patológicas. A manutenção da homeostasia ovariana requer uma precisa regulação da proliferação das células da teca. Logo, as espécies reativas de oxigênio podem apresentar um papel funcional na regulação do crescimento do mesênquima ovariano. Em condições patológicas, como na síndrome do ovário policístico (PCOS), o excessivo estresse oxidativo e a depleção de antioxidantes são apontados como fatores que contribuem para hiperplasia ovariana (Duleba et al., 2004).

Além disso, as ERO têm impacto na produção de hormônios esteróides pela célula granulosa, em particular o estrogênio, que é um importante indicador da resposta ovariana, e a positiva associação entre o estrogênio no fluido folicular e a capacidade antioxidante total sugere que esse hormônio tem um papel funcional no equilíbrio antioxidante-oxidante no ovário (Appasamy et al., 2008).

1.7 OBESIDADE E ESTRESSE OXIDATIVO

A obesidade é condição patológica na qual tem sido constatada uma produção elevada de ERO e/ou uma redução das defesas antioxidantes. O mecanismo exato pelo qual a obesidade causa patologias não está totalmente compreendido, mas é reconhecido que vias inflamatórias e endócrinas apresentam-se desreguladas no obeso (Styskal et al., 2012). Atualmente, são propostas a condição inflamatória e a indução de estresse oxidativo como potenciais mecanismos de ação para o papel da obesidade associada a morbidades (Mussad & Haynes, 2007; Savini et al., 2013).

Em indivíduos obesos, o estresse oxidativo é atribuído ao aumento de ácidos graxos livres e a hiperglicemia, fatores que também estão relacionados com a indução de inflamação no tecido adiposo por aumentarem a formação de radicais livres (Shoelson et al., 2007). A elevação crônica da circulação de ácidos graxos pode resultar em uma condição conhecida como lipotoxicidade. O acúmulo intracelular de triglicerídeos tem impacto na eficiência da mitocôndria em produzir energia para célula, pois ocasiona acúmulo de elétrons na cadeia transportadora de elétrons, prejudicando a transferência de elétrons na cadeia respiratória. Um efeito deletério deste acúmulo é o desacoplamento da fosforilação oxidativa e o estresse oxidativo (Rial et al., 2010). Estas modificações são associadas com a diminuição da fluidez da membrana mitocondrial e com danos celulares (Esposito et al., 1999, Rial et al., 2010).

A hipernutrição crônica, caracterizada por um alto teor de gorduras e carboidratos nas refeições, estimula vias intracelulares que podem ocasionar o estresse oxidativo por meio de vários mecanismos bioquímicos, incluindo a geração do radical $O_2^{\cdot-}$ pela NADPH oxidase, fosforilação oxidativa e ativação da PKC (Dadona et al., 2010). Além disso, a ingestão de dieta hipercalórica resulta em um estado pós-prandial de hiperglicemia, hipertrigliceridemia e níveis elevados de ácidos graxos livres na circulação, o que aumenta a produção de radicais livres (Esposito & Giugliano, 2006), e pode produzir um estado de estresse oxidativo sistêmico (Beckman & Ames, 1998; Patel et al., 2007).

2. JUSTIFICATIVA

Os mecanismos pelos quais a obesidade interfere na função reprodutiva em fêmeas não estão totalmente elucidados. Dois aspectos são reconhecidos por sua relação como mecanismos associados à obesidade, e incluem uma produção anormal de citocinas inflamatórias e ERO. As ERO estão envolvidas na transdução de sinal e influenciam a resposta fisiológica final desencadeada pela Ang II, a qual possui como um de seus locais de produção o tecido adiposo. Evidências indicam a existência de um SRA ovariano, além da presença de receptores da Ang II, com participação na cascata de eventos que resultam na ovulação. Cabe salientar que no ovário existe uma produção local de ERO, associadas a eventos fisiológicos que repercutem na fertilidade, e as ERO apresentam um papel fisiológico fundamental para ovulação. Portanto, é pertinente avaliar a participação da Ang II nas alterações reprodutivas desencadeadas pela obesidade e sua possível ação moduladora sobre o metabolismo oxidativo ovariano.

3. HIPÓTESE

A obesidade, desencadeada pelo consumo de alimentos palatáveis calóricos (dieta de cafeteria), altera o metabolismo oxidativo ovariano, o que está relacionado com uma diminuição na ovulação.

O sistema renina-angiotensina ovariano, que é um sistema pró- inflamatório, está envolvido na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) no ovário, a exemplo do que ocorre em outros tecidos. Portanto, o bloqueio do receptor AT1 prevenirá ou minimizará os efeitos da obesidade na ovulação.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da obesidade na ovulação, e a participação do sistema renina angiotensina como modulador da formação de espécies reativas de oxigênio em ovários de ratas obesas e seus efeitos na ovulação, por meio do bloqueio do receptor AT1.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o peso corporal e o peso da gordura abdominal e retroperitoneal em ratas submetidas à dieta da cafeteria com e sem o bloqueio do receptor AT1;
- Quantificar o número de oócitos liberados na manhã do estro em ratas submetidas à dieta da cafeteria com e sem o bloqueio do receptor AT1;
- Avaliar a defesa antioxidante enzimática no ovário em ratas submetidas à dieta da cafeteria com e sem o bloqueio do receptor AT1 na manhã do estro;
- Avaliar marcadores de dano oxidativo no ovário em ratas submetidas à dieta da cafeteria com e sem o bloqueio do receptor AT1 na manhã do estro;
- Avaliar a formação de peróxido de hidrogênio no ovário em ratas submetidas à dieta da cafeteria com e sem o bloqueio do receptor AT1 na manhã do estro;

5 METODOLOGIA

5.1 ANIMAIS

Foram utilizadas 104 ratas da variedade *Wistar* com 21 dias de idade, recém-desmamadas, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os animais foram alojados (quatro ratas por caixa residência) em um ambiente de temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 2$) e ciclo claro-escuro 12 h. Todos os procedimentos realizados durante o estudo estão de acordo com a Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que estabelece procedimentos para o uso científico de animais; assim como aquelas contidas nos Princípios Internacionais Orientadores para a pesquisa Biomédica envolvendo Animais, provenientes do *Council for International Organizations of Medical Science (CIOMS)* (Goldim, 1997). O projeto foi submetido ao comitê de ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo aprovado sob o número 21211. Os experimentos iniciaram somente após aprovação do comitê.

5.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

A partir dos 21 dias de vida, as ratas foram distribuídas em grupos: **Controle** (CTL), **Controle + Losartan** (CTL+LOS), **Cafeteria** (CAF) e **Cafeteria + Losartan** (CAF+LOS). O experimento durou 17 semanas. Em todos os grupos foram avaliados o consumo alimentar e hídrico diário, a evolução do ganho de peso corporal, o peso das gorduras abdominal e retroperitoneal.

- Grupo Controle (CTL): animais receberam ração padrão e água *ad libitum* por 17 semanas.
- Grupo Cafeteria (CAF): animais receberam dieta de cafeteria em adição a dieta padrão e água *ad libitum* por 17 semanas.
- Grupo Controle Losartan (CTL + LOS): animais receberam ração padrão e água *ad libitum*, associado à administração de losartan, por 17 semanas.
- Grupo Cafeteria Losartan (CAF + LOS): animais receberam dieta de cafeteria em adição a ração padrão e água *ad libitum*, associado à administração de losartan, por 17 semanas.

Experimento I: Avaliou o efeito da dieta da cafeteria associada à administração de Losartan, introduzidos a partir do desmame, sobre a ingestão alimentar e hídrica, a concentração plasmática de insulina de jejum e a ovulação (n=12 animais por grupo para a análise da ovulação, para as demais análises n=14 animais por grupo).

Experimento II: Avaliou o efeito da dieta da cafeteria associada à administração de Losartan, introduzidos a partir do desmame, no estresse oxidativo na ovulação de ratas (14 animais por grupo).

5.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

5.3.1 Pesagem dos Animais

Os animais foram pesados em dias alternados em balança semianalítica (Shimadzu BL 3200), e o peso representado em gramas. Os resultados obtidos foram demonstrados como peso inicial e peso corporal final. Quando decapitados também foram pesadas a gordura retroperitoneal e a abdominal, o resultado foi representado em gramas.

5.3.2 Método de avaliação da ingestão alimentar e hídrica

A ingestão alimentar foi avaliada por meio da medida diária, a cada 24 horas, de cada item alimentar, com auxílio de uma balança digital semi-analítica (Shimadzu BL 3200). Por meio da quantidade pesada inicialmente menos o peso da quantidade restante foi determinada a quantidade ingerida de cada alimento. Para as medidas de ingestão hídrica foram utilizadas provetas graduadas. A ingestão de líquidos foi avaliada ao subtrair o volume restante nas mamadeiras do volume ofertado (Goulart et al., 2012).

Os dados de ingestão de cada alimento e as informações nutricionais contidas nos rótulos dos produtos foram utilizados para quantificar a ingestão energética (kcal). O cálculo da energia ingerida foi realizado com base no consumo diário dos alimentos ingeridos separadamente multiplicado pelo seu respectivo conteúdo calórico. A soma da ingestão diária de cada alimento foi dividida pelo número de animais de cada grupo. Os dados representam uma estimativa do consumo, e estão representados como média da ingestão por animal/ dia na 17^a semana de experimento.

5.3.3 Dieta de Cafeteria e Dieta Padrão

A partir dos 21 dias de vida durante 17 semanas, foram ofertados diariamente aos animais do grupo cafeteria e cafeteria losartan três tipos de dietas distintas (A, B e C), compostas por alimentos frescos, conforme a tabela 1, intercalados ao decorrer dos dias, além de refrigerante de cola sem gás, ração de biotério e água. As porções de cada alimento e os volumes de líquidos foram constantemente ajustadas conforme o controle da ingestão alimentar e hídrica, para todos os grupos experimentais (Goulart et al., 2012). As dietas foram oferecidas diariamente no mesmo horário e as ratas tinham acesso a todos os componentes das dietas. Aos animais do grupo controle e controle losartan foi ofertado somente ração padrão e água *ad libitum* (Dieta Padrão). A ração de biotério Nuvilab CR-1(NUVITAL, Brasil) é composta por 55% de carboidratos, 22% de proteínas e 4,5% de lipídeos, com o total de 2,95 Kcal/g (informações fornecidas pelo fabricante).

Tabela 1. Grupos alimentares ofertados em dias alternados

DIETA	Qtd(g)	Kcal	Carboidratos (g)	Proteínas (g)	Lipídeos (g)	Na (mg)
DIETA A						
Ração padrão (Nuvital, Brasil)	1,00	2,95	0,55	0,22	0,04	2,70
Salame (Majestade, Brasil)	1,00	3,38	0,00	0,32	0,24	12,48
Bisnaguinha Seven boys (Seven Boys, Brasil)	1,00	2,95	0,53	0,09	0,04	4,70
Yokitos bolinha de queijo (Yoki, Brasil)	1,00	4,80	0,60	0,06	0,24	11,04
Deliket Jelly bean (Dori Alimentos, Brasil)	1,00	3,80	0,95	0,00	0,00	0,20
Coca-cola (coca-cola, Brasil)	1,00	0,43	0,11	0,00	0,00	0,05
DIETA B						
Ração Padrão (Nuvital, Brasil)	1,00	2,95	0,55	0,22	0,04	2,70
Linguiça fininha defumada (Perdigão, Brasil)	1,00	3,18	0,01	0,18	0,32	15,73
Bolo de chocolate (Nutrella, Brasil)	1,00	3,25	0,50	0,05	0,12	6,18
Biscoito Maisena (Isabela, Brasil)	1,00	4,30	0,73	0,07	0,12	4,33
Marshmallow (Fini, Brasil)	1,00	3,40	0,80	0,05	0,00	0,46
Coca-cola (coca-cola, Brasil)	1,00	0,43	0,11	0,00	0,00	0,05
DIETA C						
Ração Padrão (Nuvital, Brasil)	1,00	2,95	0,55	0,22	0,04	2,70
Presunto com capa de gordura (Sadia, Brasil)	1,00	1,55	0,00	0,17	0,17	0,33
Salgadinho Fritello (Paviolli, Brasil)	1,00	5,08	0,52	0,08	0,08	6,40
Biscoito Waffer de chocolate (Bauduco, Brasil)	1,00	5,20	0,63	0,05	0,05	1,13
Bala de goma (Dori Alimentos, Brasil)	1,00	3,60	0,90	0,00	0,00	0,50
Coca-cola (coca-cola, Brasil)	1,00	0,43	0,11	0,00	0,00	0,05

*Dados obtidos dos rótulos dos produtos ou do site dos fabricantes.

5.3.4 Administração oral do losartan

O antagonista do receptor AT1 da angiotensina II losartan foi administrado diariamente, a partir do desmame durante as 17 semanas de experimento, na dose de 10 mg/kg/ml por dia na água, adaptado de trabalho prévio (Donadio et al., 2007). No primeiro dia de oferta do fármaco, a determinação do volume médio que cada rata com 21 dias de idade ingere de água foi baseada em uma curva de ingestão hídrica de estudos anteriores do nosso grupo e no peso corporal medido no início do experimento. Nos dias posteriores, por meio do monitoramento do consumo diário de água e no ganho de peso dos animais ao longo do experimento, foram sendo realizados ajustes sempre que necessários, a fim de manter a dose ao decorrer do experimento.

5.3.5 Determinação do Ciclo Estral

A partir do 70º dia de experimento, realizou-se a citologia vaginal diária, no início da tarde, em que, com auxílio de um conta-gotas contendo solução salina (NaCl 0,9%), o epitélio vaginal da fêmea era “lavado” e o material coletado analisado a fresco com auxílio de microscópio óptico, o que permitia determinar em que fase do ciclo estral cada rata encontrava-se. A identificação da fase correspondente ao ciclo estral como proestro, estro, metaestro ou diestro foi efetuada de acordo com a característica celular do material coletado, conforme descrito por Freeman (1988).

5.3.6 Obtenção e preparo da amostra para: LPO, concentração de H₂O₂ e atividade enzimática.

Após o período de 17 semanas de experimento, os animais foram submetidos à eutanásia em guilhotina manual na manhã do estro, tendo em seguida, os ovários rapidamente extraídos, separados do tecido e da gordura circundante, pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Após os procedimentos acima expostos foram armazenados a -80° C para posterior análise de parâmetros oxidativos. No momento das dosagens os ovários foram homogeneizados por 30 segundos em Ultra – Turrax, na presença de KCl 1,15% e de fluoreto de fenil metil sulfonida (PMSF) na concentração de 100 mmol/l em isopropanol. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 1000 G em centrífuga refrigerada

(Sorvall RC 5B-Rotor SM 24), após o sobrenadante foi retirado, separado em alíquotas, para posteriores dosagens, e congelado em freezer a -80°C (Llesuy et al., 1985).

5.3.7 Coleta de sangue para dosagem de insulina

Ao fim de cada experimento, na manhã do estro e com 12 horas de jejum, o sangue foi coletado por meio da decapitação dos animais, com o uso de funis e tubos de ensaio previamente heparinizados. O sangue foi centrifugado a 3000 rpm durante 15 minutos em centrífuga refrigerada, em seguida o plasma separado em alíquotas e armazenado à -80°C .

As concentrações plasmáticas de insulina foram determinadas por meio de kits de Elisa (Enzyme-Liked Immunoabsorbent Assay) da marca Millipore (Millipore, MO, USA). O teste possui sensibilidade de detecção de 0,2 ng/ml. Os resultados foram apresentados como insulina ng/ml.

5.4 CONTAGEM DO NÚMERO DE OÓCITOS

Na manhã do estro (07h30min), os ovários, não utilizados para análises de parâmetros oxidativos, foram removidos e os ovidutos dissecados, lavados com solução salina 0,9% e mantidos em placa de vidro sobre gelo. Após foram fixados entre duas lâminas e comprimidos, com o auxílio de um prensador manual, para contagem do número de oócitos por meio do uso de um microscópio óptico (Zeiss, Goettingen, Germany) com lentes de aumento 2,5 x (Gomes et al., 1999). O número de oócitos de ambos os ovidutos foram contados, em separado e as imagens de cada oviduto foram registradas através de um sistema de captura de imagens acoplado ao microscópio. Para a análise dois observadores efetuaram a contagem em separado, garantindo que um deles nunca soubesse a que grupo pertencia a estrutura que estava sendo observada.

5.5 MEDIDAS DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTE

5.5.1 Superóxido Dismutase (SOD)

Para medir a atividade da enzima SOD, foi utilizada a técnica de inibição da auto-oxidação do pirogalol, de acordo com Maklund (1985). Portanto, quanto maior a concentração

de SOD na amostra, menor a auto-oxidação do pirogalol. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 420 nm. Os resultados foram expressos em unidade por miligrama de proteína (U/mg proteína).

5.5.2 Catalase (CAT)

A atividade da enzima antioxidante enzimática CAT foi determinada com referência à técnica de Aebi (1984), em cubeta de quartzo. O método está baseado na taxa de decomposição enzimática do H₂O₂, através do monitoramento da diminuição da absorbância em espectrofotômetro. Como a atividade da enzima catalase é diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio, obedece a uma cinética de pseudo-primeira ordem, essa enzima pode ter sua atividade medida por meio da avaliação do consumo de peróxido de hidrogênio. O procedimento consiste na adição de 955µl de tampão fosfato em 10µl de amostra em cubeta de quartzo. Feito a leitura em espectrofotômetro, foi descontado contra um branco de tampão fosfato, em seguida, adicionados 35µl do peróxido de hidrogênio e se observou a diminuição da absorbância a 240nm. Os resultados foram expressos em pmoles por mg de proteína.

5.5.3 Dosagem de proteínas

O teor de proteínas do tecido foi quantificado através do método colorimétrico de Lowry (1951), sendo utilizada a albumina bovina sérica na concentração de 1mg/mL como padrão. Para a realização da dosagem foram utilizados os seguintes reagentes:

- Reativo de Folin Ciocalta diluído em água destilada na proporção 1:3
- NaHCO₃ (Bicarbonato de sódio) 2% em NaOH (Hidróxido de sódio) 0,1N
- CuSO₄.5H₂O (Sulfato de cobre) 1%
- KNaC₄H₄O₆.4H₂O (Tartarato de sódio e potássio) 2%

5.6 CONCENTRAÇÕES DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂)

O método está baseado na oxidação do vermelho de fenol pelo peróxido de hidrogênio, mediado pela peroxidase de rabanete, resultando na formação de um composto que pode ser analisado por meio do uso de um espectrofotômetro a 610nm. A determinação foi realizada adicionando-se à amostra uma solução tampão de vermelho de fenol 0,28mmol/l, dextrose 5mM e peroxidase de rabanete 8,5U/ml. Após o intervalo de 25 minutos, foi adicionado NaOH 1mol/l e efetuada a leitura a 610nm. Os resultados foram expressos em nmoles de H₂O₂ por mg de proteína (Pick & Keisai, 1980).

5.7 MARCADORES DE DANO OXIDATIVO

5.7.1 Quimiluminescência

A determinação da quimiluminescência (QL) consiste na adição de um hidroperóxido orgânico de origem sintética (hidroperóxido de tert-butil) ao homogeneizado de tecido, para avaliar a capacidade de resposta produzida pela amostra, mediante a emissão de luz. O método baseia-se na característica dos hidroperóxidos, que são espécies químicas instáveis, podem reagir com lipídios e formarem produtos que emitem luz por meio de uma reação radicalar. Para a medida da QL foi utilizado um contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer – 1215; LKB Produkter AB, Bromma, Sweden) com o circuito de coincidência desconectado, operando como um luminômetro.

As medidas foram realizadas em sala escura, com os frascos de vidro mantidos na penumbra, para evitar ativação da fosforescência pela luz fluorescente. O procedimento experimental consistiu na adição de 2ml de tampão (KCl 140mmol/l e fosfato 20mmol/l) em pH 7,4 e verificou-se, primeiramente, a emissão de luz dos frascos apenas com tampão. Após, foi adicionado 50µl do homogeneizado de ovário, e realizada a leitura da QL basal. Em seguida, foi adicionado 15µl do hidroperóxido de tert-butil e acompanhada a emissão máxima de luz (Gonzalez-Flecha et al., 1991). Os resultados foram expressos como contagens por segundo (cps) por miligrama (mg) de proteína.

5.7.2 Medida dos níveis de proteínas oxidadas: ensaio das carbonilas oxidadas

O dano oxidativo a proteínas foi medido pela determinação de carbonilas, baseado na reação da 2,4 dinitro fenil hidrazina (DNPH) com proteínas oxidadas do plasma sanguíneo em meio ácido, conforme a técnica descrita por Reznick e Packer (1994). São realizadas sucessivas lavagens com ácidos e solventes orgânicos, e ao término é realizada a incubação com guanidina. A absorvância das carbonilas foi medida em espectrofotômetro a 360 nm. Para a realização da medida foram utilizados os seguintes reagentes:

- Guanidina (6M) em HCl (2,5 M) pH 2,5
- 2,4 dinitro fenil hidrazina (DNPH) em HCl (2,5 M)
- TCA 20% e TCA 10%
- Etanol – acetato de etila 1:1 (v/v)

Os resultados foram expressos como carbonila nmol / mg de proteína.

5.8 ESTATÍSTICA

Todas as análises foram realizadas usando o programa estatístico GraphPad Prisma 5.04 (GraphPad Software, CA, USA) e com auxílio do programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS 16), os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão médio (EPM). Foi testada a normalidade dos dados através do método de Shapiro – Wilk, e o comportamento paramétrico ou não paramétrico através do teste de Bartlett. Para comparações entre os grupos experimentais expostos a dois efeitos (dieta e losartan) utilizou-se a análise de variância (ANOVA) de duas vias. Para comparação do peso inicial dos grupos experimentais utilizou-se análise de variância (ANOVA) de uma via. Para comparações de uma variável entre dois grupos utilizou-se o teste T de Student. Em todos os casos, o nível de significância considerado foi $P < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Experimento 1: Efeito da dieta de cafeteria associada a administração de losartan, introduzidos a partir do desmame, sobre a ovulação, a ingestão alimentar e hídrica.

6.1.1 Ingestão alimentar e hídrica

A figura 3 representa a ingestão energética total (Kcal) /animal/dia de ratas que receberam a dieta de cafeteria, a partir do desmame, em adição à ração padrão durante 17 semanas. Na 17^a semana de experimento, uma maior quantidade de energia foi consumida pelos animais do grupo CAF quando comparado ao grupo CTL ($P < 0,0001$). O losartan foi administrado a partir do desmame durante todo o experimento, esse fármaco não alterou a ingestão de energia entre os grupos controles (CTL vs CTL LOS), mas induziu a um menor consumo de energia no grupo CAF LOS em comparação ao grupo CAF. O tipo de alimentação influenciou significativamente o consumo de energia [$F(1;24)=49,08$; $P < 0,0001$] nos grupos experimentais, também ocorreu efeito significativo do fármaco [$F(1;24)=6,736$; $P=0,0159$], mas sem interação entre o tipo de alimentação e o fármaco [$F(1;24)=0,3607$; $P=0,5538$]. Apesar da diminuição na ingestão de energia total, o grupo CAF LOS ainda manteve um aumento significativo na quantidade de energia consumida quando comparado aos grupos controles ($P < 0,0001$).

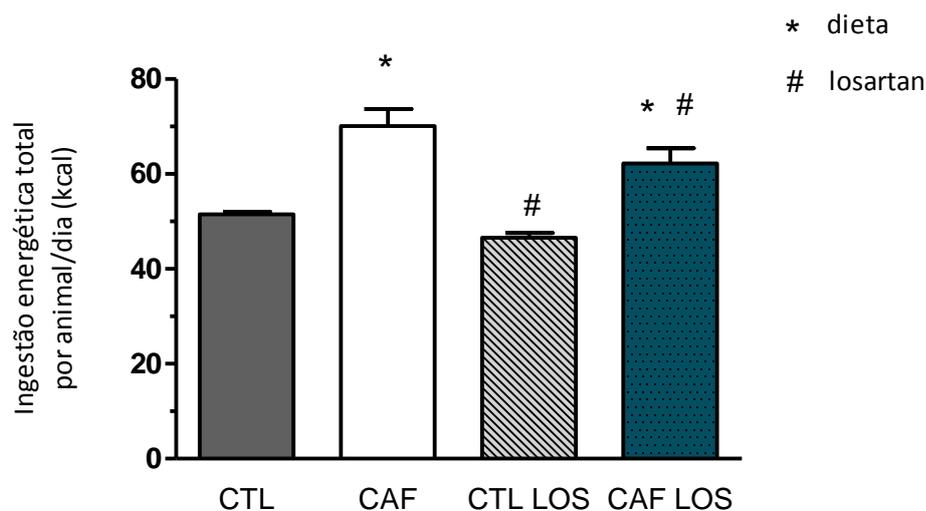


Figura 3. Ingestão energética total por animal/dia na 17^a semana. Resultados expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) dos grupos controle (CTL), controle losartan (CTL LOS), cafeteria (CAF) e cafeteria losartan (CAF LOS). ANOVA de duas vias. * significa diferenças entre dieta padrão e dieta cafeteria; # significa diferença entre o tratamento com e sem losartan, em ambos considerando $P < 0,05$.

Ao analisar o consumo de energia (Kcal) proveniente da ingestão apenas de alimentos sólidos (ração padrão e sólidos palatáveis para os grupos cafeteria), na 17^a semana de experimento, sem as calorias fornecidas pelo consumo de refrigerante pelos grupos cafeteria, a ingestão de energia entre CAF e CTL assemelha-se. No entanto, o losartan ocasionou um menor consumo de energia no grupo CAF LOS em relação ao CAF. Esses animais que receberam o fármaco simultaneamente com a dieta de cafeteria consumiram menos energia proveniente de alimentos sólidos do que os grupos controle. A ingestão de energia a partir de alimentos sólidos não sofreu influência da dieta [F(1;24)=3,532; P=0,0724], quanto ao losartan o efeito foi significativo [F(1;24)=12,84; P=0,0015], e não ocorreu interação entre as variáveis dieta e losartan [F(1;24)=2,802; P=0,1071]. Os dados são apresentados na figura 4.

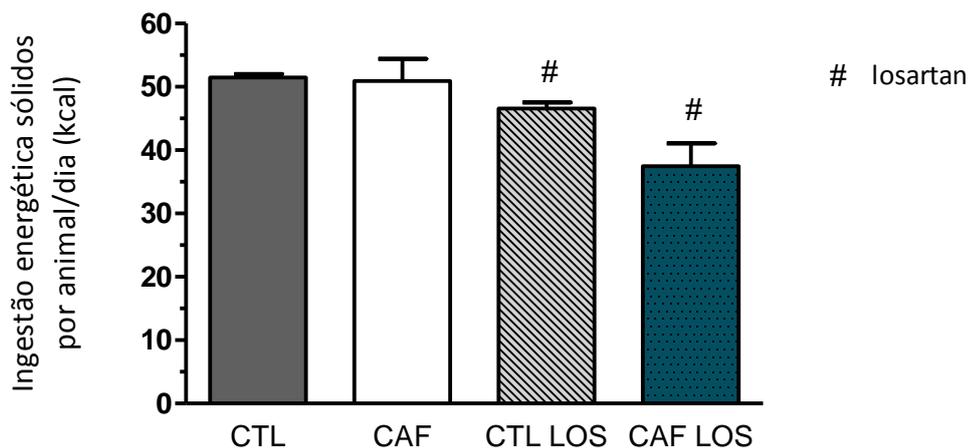


Figura 4. Ingestão energética de sólidos por animal/dia na 17^a semana. Resultados expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) dos grupos controle (CTL), controle losartan (CTL LOS), cafeteria (CAF) e cafeteria losartan (CAF LOS). ANOVA de duas vias. # significa diferença entre o tratamento com e sem losartan, em ambos considerando P<0,05.

Na figura 5 está apresentado o consumo em gramas de ração padrão, percebe-se que apesar do grupo CAF ter ingerido a mesma quantidade de energia (Kcal) de alimentos sólidos comparado ao grupo CTL (fig.4), o consumo de ração padrão em gramas difere entre os grupos. O grupo CAF ingeriu menos ração padrão que o grupo CTL (P<0,001), durante o mesmo período, exercendo o tipo de alimentação um efeito significativo sobre a ingestão de ração padrão [F(1;24)=1356; P<0,0001]. O bloqueio do receptor AT1 da Ang II pelo fármaco losartan apresentou efeito significativo [F(1;24)=26,68; P<0,0001], mas sem interação entre o

tipo de alimentação e o fármaco [$F(1;24)=1,136$; $P=0,2971$]. A administração do losartan resultou em uma diminuição da ingestão de ração padrão, que foi mais acentuada no grupo CAF LOS e resultou em menor consumo de ração padrão quando comparado ao grupo CAF. Entre CTL LOS e CAF LOS a diferenças se mantiveram, a ingestão de ração permaneceu diminuída nos animais que receberam a dieta de cafeteria independente do bloqueio do receptor AT1.

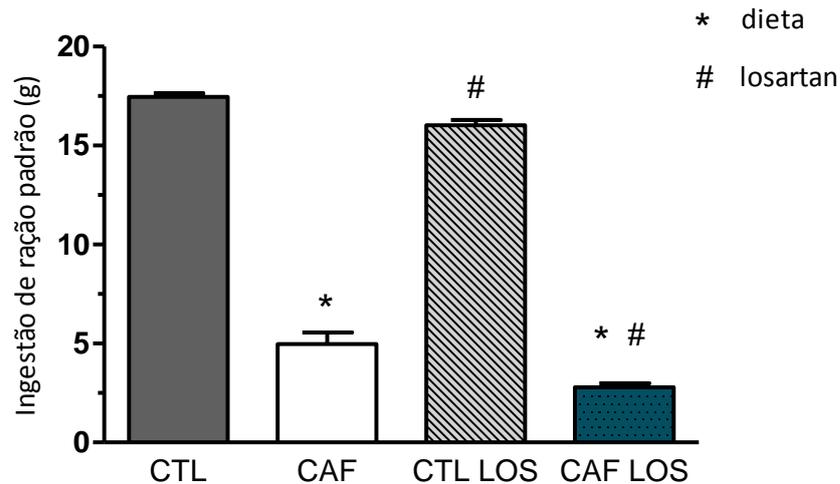


Figura 5. Ingestão em gramas de ração padrão por animal/dia na 17ª semana. Resultados expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) dos grupos controle (CTL), controle losartan (CTL LOS), cafeteria (CAF) e cafeteria losartan (CAF LOS). ANOVA de duas vias. * significa diferenças entre dieta padrão e dieta cafeteria; # significa diferença entre o tratamento com e sem losartan, em ambos considerando $P<0,05$.

A ingestão líquida total (mL) por animal por dia (representada por água e refrigerante nos grupos cafeteria) está representada na figura 6. A ingestão foi significativamente maior no grupo CAF em relação ao CTL ($P>0.001$), no decorrer da 17ª semana. Efeito significativo para o tipo de alimentação foi observado [$F(1;24)=742,0$; $P<0,0001$]. O losartan influenciou o consumo hídrico no grupo CTL LOS quando comparado ao CTL e aos demais grupos, resultando em menor ingestão líquida total. No entanto, ao ser administrado ao grupo CAF LOS não se observa o mesmo efeito. Interessantemente, no grupo CAF LOS a ingestão líquida total foi superior ao grupo CAF e manteve-se superior aos grupos controle ($P<0,001$). Ocorreu efeito significativo para a administração do fármaco [$F(1;24)=8,835$; $P=0,0066$], também foi encontrado interação entre o tipo de alimentação e o fármaco [$F(1;24)=58,61$; $P<0,0001$].

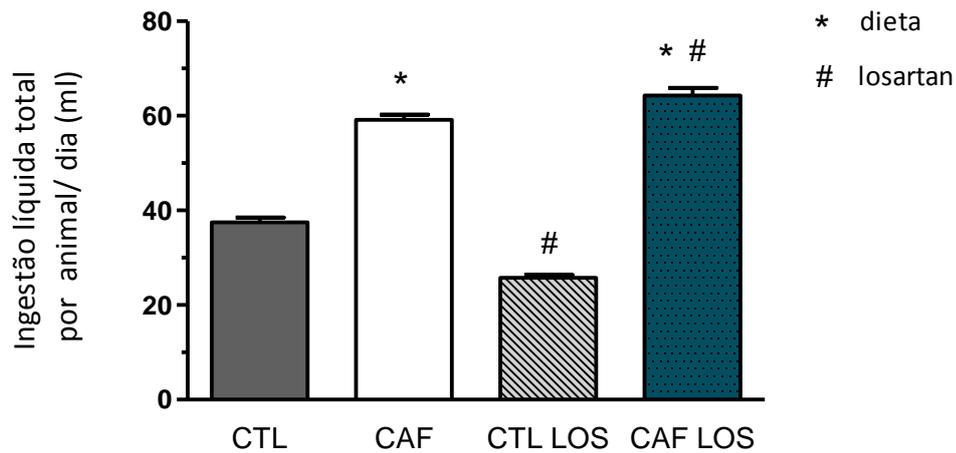


Figura 6. Ingestão líquida total por animal/dia na 17^a semana. Resultados expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) dos grupos controle (CTL), controle losartan (CTL LOS), cafeteria (CAF) e cafeteria losartan (CAF LOS). ANOVA de duas vias. * significa diferenças entre dieta padrão e dieta cafeteria; # significa diferença entre o tratamento com e sem losartan, em ambos considerando $P < 0,05$.

Quando analisada a ingestão líquida apenas considerando o consumo de água (fig.7), no mesmo período do experimento, o grupo CAF apresentou uma menor ingestão comparada ao grupo CTL ($P < 0,0001$), ao contrário do que ocorre em relação à ingestão líquida total (fig.6). Ocorreu efeito significativo devido à dieta [$F(1;24)=620,5$; $P < 0,0001$] e para o losartan [$F(1;24)=125,4$; $P < 0,0001$], porém não há interação entre as variáveis [$F(1;24)=3,951$; $P=0,0584$]. O efeito do losartan é percebido em ambos os grupos que receberam o fármaco (CTL LOS e CAF LOS), ocasionando nesses animais uma redução na ingestão hídrica ($P < 0,0001$) em comparação aos seus respectivos controles, mas o CAF LOS mantém uma menor ingestão hídrica em relação ao CTL LOS. Observa-se que o grupo CAF LOS ingeriu menos água em comparação ao grupo CAF, o que corresponde a aproximadamente menos da metade do volume ingerido pelo grupo CAF, como mostra a figura 7.

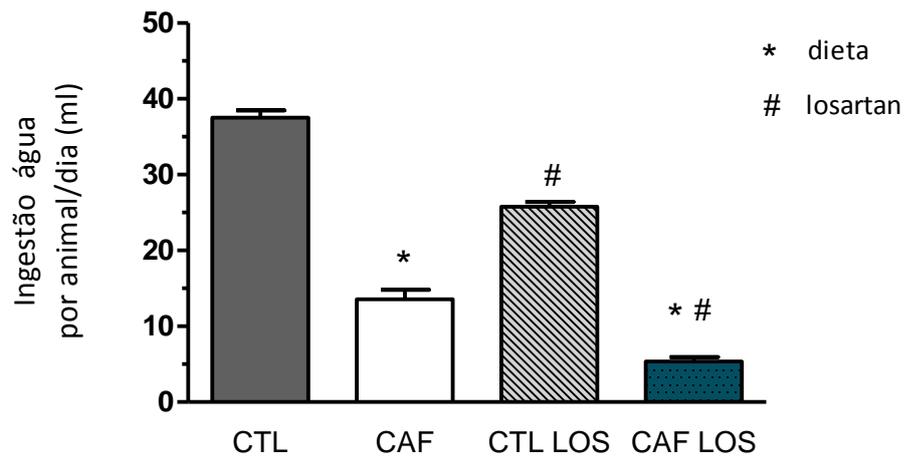


Figura 7. Ingestão de água por animal/dia na 17^a semana. Resultados expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) dos grupos controle (CTL), controle losartan (CTL LOS), cafeteria (CAF) e cafeteria losartan (CAF LOS). ANOVA de duas vias. * significa diferenças entre dieta padrão e dieta cafeteria; # significa diferença entre o tratamento com e sem losartan, em ambos considerando $P < 0,05$.

Na figura 8 está representado o consumo de refrigerante entre os grupos cafeteria no decorrer da 17^a semana. A ingestão da bebida foi significativamente maior no grupo que recebeu a administração do losartan (CAF vs CAF LOS, $P < 0,0001$), contribuindo para a maior ingestão líquida total nesse grupo como foi apresentado na fig.6.

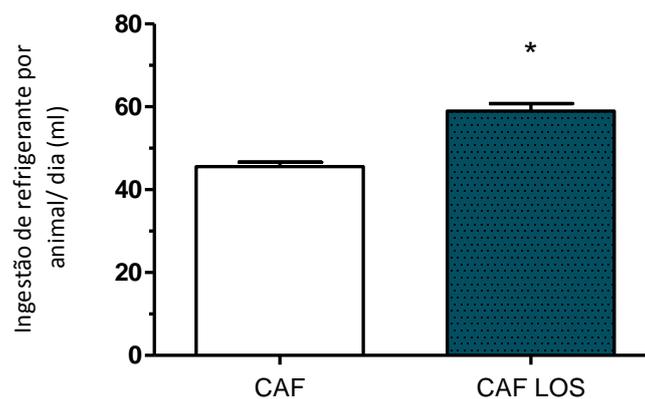


Figura 8. Ingestão de refrigerante por animal/dia na 17^a semana. Resultados expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) dos grupos cafeteria (CAF) e cafeteria losartan (CAF LOS). Teste T de Student, * significa diferença estatística considerando $P < 0,05$.

O consumo de sódio foi elevado no grupo CAF em relação aos controles. A administração de losartan não interferiu no consumo de sódio, mantendo os grupos cafeteria e controle a diferença em relação à ingestão de sódio. Ocorreu efeito significativo do tipo de alimentação [F(1;24)=27,78; P<0,0001], mas não para o fármaco [F(1;24)=0,9305; P=0,6465], porém não há interação entre os fatores [F(1;24)=0,2157; P=0,3444]. Ao analisar o consumo de carboidratos observamos que os animais que receberam a dieta de cafeteria consumiram mais carboidratos, e nesse caso o losartan diminuiu o consumo de carboidratos, mas ainda assim o grupo CAFLOS apresentou uma maior ingestão em relação ao seu controle (CTLLOS). Ocorreu efeito do tipo de alimentação [F(1;24)=51,01; P<0,0001] e para o fármaco [F(1;24)=9,795; P=0,0046], e ausência interação [F(1;24)=0,3041; P=0,5864]. A ingestão de proteínas, ao contrário, reduz significativamente nos grupos que consomem a dieta de cafeteria, o losartan não alterou o consumo de proteínas, os grupos CAFLOS vs CTLLOS mantiveram-se distintos. Apenas o tipo de alimento exerceu efeito significativo sobre o parâmetro [F(1;24)=53,72; P<0,0001], para o fármaco o efeito não foi significativo [F(1;24)=4,162; P=0,0525], não há interação entre os fatores [F(1;24)=0,3578; P=0,5553]. A oferta da dieta de cafeteria resultou no consumo acentuado de lipídeos, sendo esse o padrão alimentar que sofreu maior influência pelo tipo de alimentação [F(1;24)=38,79; P<0,0001]. O losartan não influenciou o consumo de lipídeos [F(1;24)=0,9660; P=0,3355] e não observamos interação [F(1;24)=0,3041; P=0,5864]. Os resultados estão apresentados na figura 9.

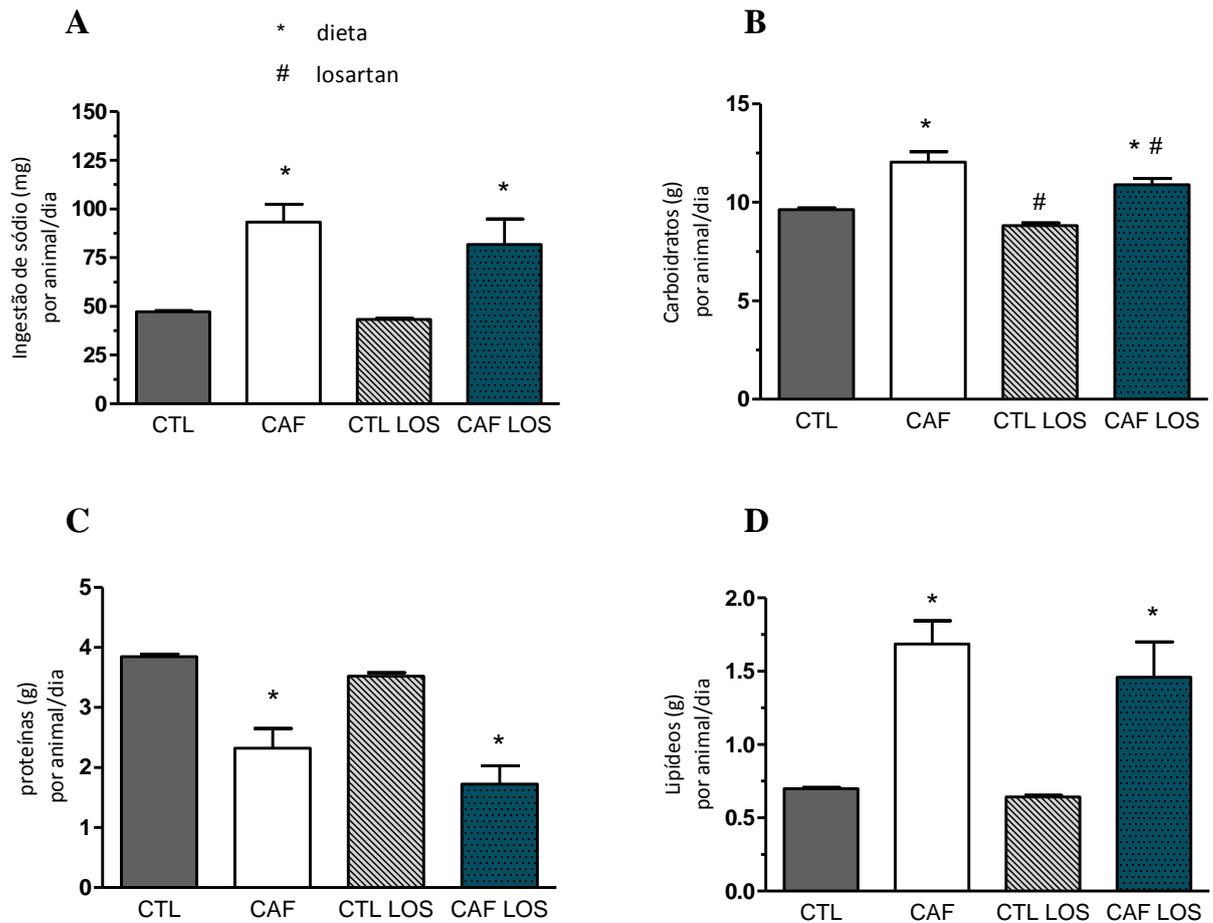


Figura 9. Ingestão de sódio (mg) por animal/dia (A), Ingestão de carboidratos (g) por animal/dia (B), Ingestão de proteínas (g) por animal/dia (C) e Ingestão de lipídeos (g) por animal/dia (D) na 17^a semana. Resultados expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) dos grupos controle (CTL), controle losartan (CTL LOS), cafeteria (CAF) e cafeteria losartan (CAF LOS). ANOVA de duas vias. * significa diferenças entre dieta padrão e dieta cafeteria; # significa diferença entre o tratamento com e sem losartan, em ambos considerando $P < 0,05$.

A figura 10 representa a evolução da ingestão de água durante todas as semanas de experimento. A partir da 3ª semana de administração do losartan na água de beber, o consumo de água reduziu no grupo CTL LOS comparado ao grupo CTL ($P<0.05$), permanecendo reduzido durante quase todo o experimento. No grupo CAF LOS o consumo de água diminuiu na 2ª e na 4ª semana, e a partir da 7ª semana permanece abaixo do consumo de água do grupo CAF ($P<0.05$).

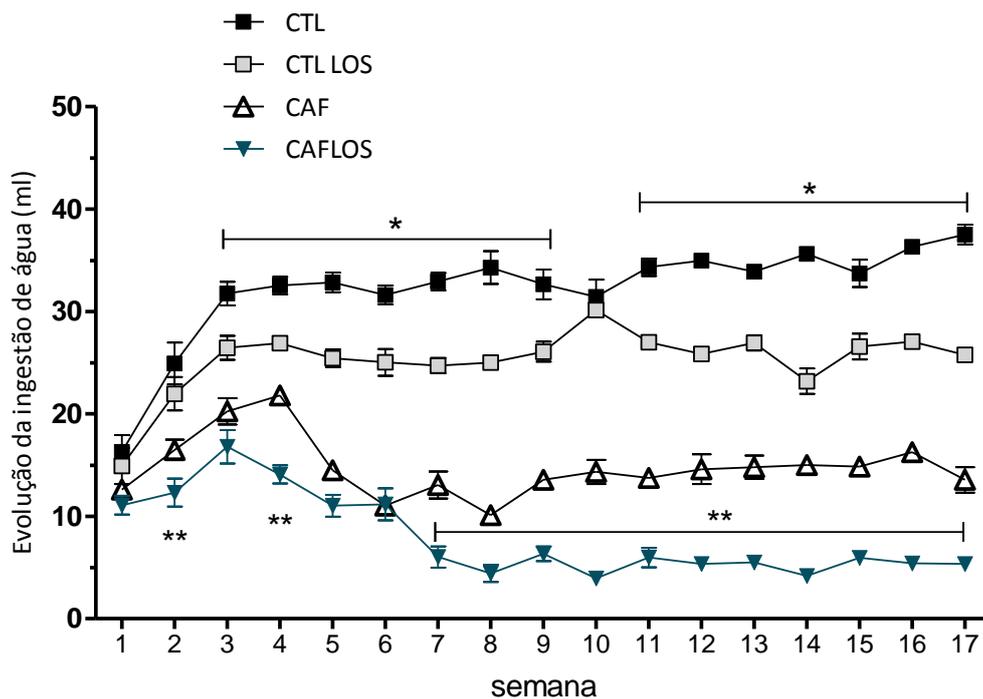


Figura 10. Evolução da ingestão de água por animal/dia na 17ª semana. Resultados expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) dos grupos controle (CTL), controle losartan (CTL LOS), cafeteria (CAF) e cafeteria losartan (CAF LOS). ANOVA de duas vias de medidas repetidas com pós-teste Bonferroni. * representa diferenças significativas entre CTL vs CTL LOS, com $P<0.05$. ** representa diferenças significativas entre CAF vs CAF LOS, com $P<0.05$.

6.1.2 Concentrações de jejum de insulina plasmática

As concentrações de jejum de insulina plasmática estavam elevadas no grupo que recebeu a dieta de cafeteria (CAF) quando comparado ao grupo CTL. O efeito causado pelo tipo de alimentação foi significativo [F(1;34)=44,05; P<0,0001]. Quando administrado o Losartan os grupos controle mantiveram concentrações similares do hormônio, no entanto, no grupo CAF LOS o fármaco reduziu significativamente a concentração de jejum da insulina (CAF vs CAF LOS, P<0,0001), mas ainda assim esse grupo apresentou valores superiores ao grupo controle, o efeito da dieta permaneceu. O fármaco apresentou efeito significativo sobre as concentrações de insulina [F(1;34)=7,904; P=0,0081] e ocorreu interação entre os fatores tipo de alimentação e fármaco [F(1;34)=5,453; P=0,0256]. Os resultados encontram-se na figura 11.

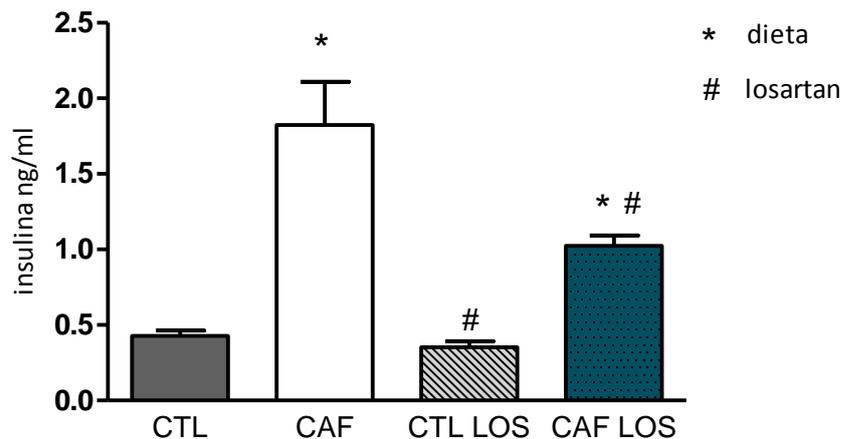


Figura 11. Concentração da insulina plasmática, avaliada após 17 semanas de experimento. Resultados expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) dos grupos controle (CTL), controle losartan (CTL LOS), cafeteria (CAF) e cafeteria losartan (CAF LOS). ANOVA de duas vias. * representa diferenças significativas devido à dieta; # representa diferenças significativas devido ao losartan, em ambos considerando P<0,05.

6.1.3 Contagem de oócitos

Observando a figura 12 o resultado demonstra o efeito da obesidade induzida pela oferta da dieta de cafeteria na ovulação de ratas que receberam a dieta, a partir do desmame, em adição a ração padrão durante 17 semanas, e o efeito da associação de losartan. Ocorreu interação entre a variável dieta e losartan [$F(1;37)=4,328$, $P=0,0445$], o efeito da dieta não foi significativo [$F(1;37)=2,965$, $P=0,0934$], assim como não ocorreu alteração significativa no número de oócitos ovulados quando administrado o losartan [$F(1;37)=0,255$, $P=0,6377$]. A média de oócitos no grupo cafeteria comparada ao grupo controle: CTL $11,50 \pm 0,7638$ vs CAF $5,250 \pm 1,719$, entre os controles CTL $11,50 \pm 0,7638$ vs CTL LOS $7,300 \pm 1,535$, e entre os grupos cafeteria CAF $5,250 \pm 1,719$ vs CAF LOS $7,889 \pm 2,233$.

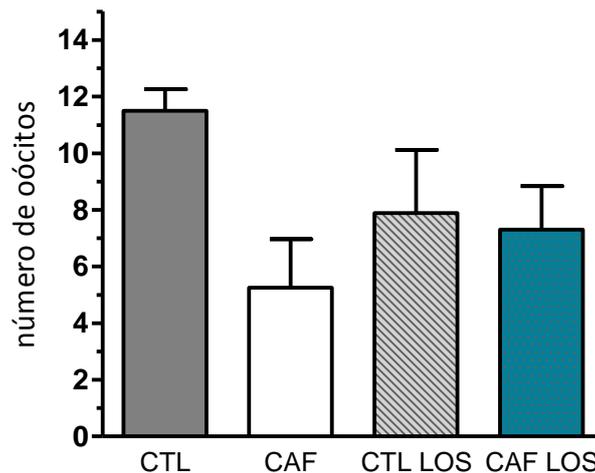


Figura 12. Contagem do número de oócitos na manhã do estro em ratas adultas. Resultados expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) dos grupos controle (CTL), controle losartan (CTL LOS), cafeteria (CAF) e cafeteria losartan (CAF LOS). ANOVA de duas vias. $P>0,05$.

6.2. Experimento 2: Efeito da dieta de cafeteria associada a administração de losartan, introduzidos a partir do desmame, sobre parâmetros oxidativos medidos na manhã do estro no ovário de ratas.

A tabela 2 representa os dados morfométricos referentes ao peso corporal no primeiro dia de experimento (21 dias de idade) e o peso corporal após o período de 17 semanas de oferta da dieta de cafeteria (idade adulta). Os grupos experimentais apresentavam a mesma média de peso corporal inicial ($P > 0,05$), mas no decorrer do consumo da dieta de cafeteria, em adição à ração padrão, os grupos CAF e CAF LOS obtiveram maior ganho de peso comparado aos grupos controle ($P < 0,001$). A administração do losartan não influenciou no peso corporal final [$F(1;42)=1,514$], apenas o efeito da dieta [$F(1;42)=80,99$] foi significativo e não ocorreu interação entre as variáveis dieta e Losartan [$F(1;42)=1,641$].

Tabela 2. Medida do ganho de peso corporal (em gramas) dos grupos experimentais.

GRUPO	PESO CORPORAL INICIAL (g)	PESO CORPORAL FINAL (g)
CTL	42,36 ± 0,5498	256,1 ± 6,679
CTL LOS	42,55 ± 0,6210	256,4 ± 2,988
CAF	42,65 ± 0,8651	314,2 ± 5,812*
CAF LOS	42,80 ± 1,2980	300,0 ± 7,058*

Valores representam a média ± erro padrão médio. * diferença significativa para o efeito da dieta. Anova de uma via, com pós-teste de Bonferroni (peso corporal final); Anova de duas vias (peso corporal final), * significa diferença estatística devido à dieta, considerando $P < 0,0001$.

O peso dos ovários em todos os grupos foi semelhante ($P>0,05$), assim como a relação do peso ovariano pelo peso corporal ($P>0,05$), após 17 semanas de experimento. Nenhuma influência da dieta [$F(1;44)=0,1756$; $P=0,6773$], ou do losartan [$F(1;44)=0,9260$; $P=0,3412$] foi verificada para o peso dos ovários, e não ocorreu interação entre as variáveis analisadas [$F(1;44)=0,01364$; $P=0,9076$]. Os resultados são apresentados na figura 13.

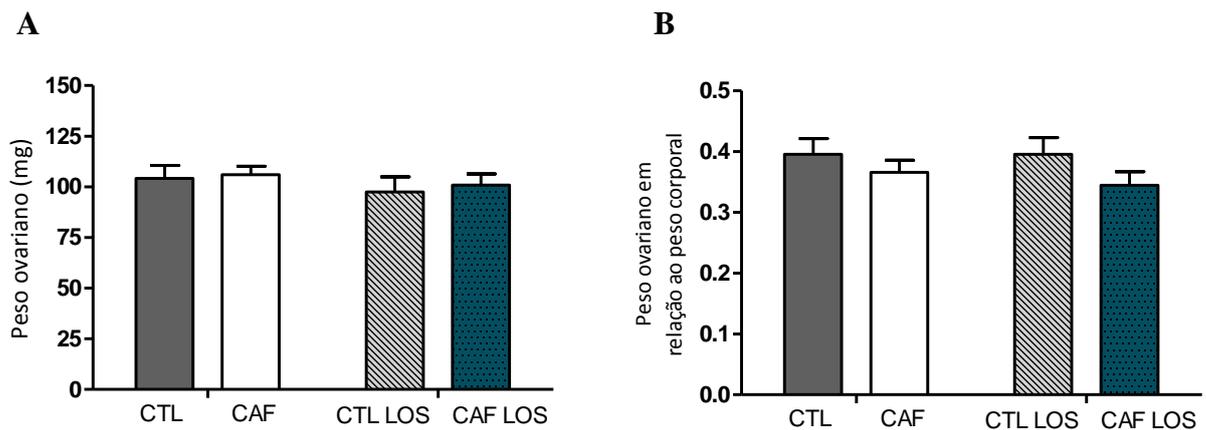


Figura 13. Peso ovariano (A) e Peso ovariano dividido por peso corporal $\times 10^3$ (B). Resultados expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) dos grupos controle (CTL), controle losartan (CTL LOS), cafeteria (CAF) e cafeteria losartan (CAF LOS). ANOVA de duas vias. $P>0,05$.

A figura 14 apresenta os pesos da gordura abdominal (A) e retroperitoneal (B) após 17 semanas de oferta da dieta de cafeteria em associação com a administração de losartan. Os grupos experimentais que receberam a dieta em adição à ração padrão apresentaram um aumento de adiposidade ($P<0,05$). Ao administrarmos o antagonista losartan, a partir do desmame, ocorreu uma atenuação do acúmulo de gordura abdominal (A) que foi significativa para o grupo CAF LOS em relação ao CAF. No entanto, o grupo CAF LOS ainda se manteve com maior ganho de peso da gordura abdominal comparado ao grupo controle. Efeitos significativos para o tipo de alimentação [$F(1;43)=91,33$; $P<0,0001$] e fármaco (losartan) [$F(1;43)=4,935$; $P=0,0316$] foram observados, mas sem interação entre esses fatores [$F(1;43)=0,8855$; $P=0,3520$]. A administração de losartan não alterou o peso da gordura retroperitoneal no grupo controle (CTL vs CTL LOS), o peso da gordura retroperitoneal foi influenciado apenas pelo tipo de alimentação [$F(1;43)=54,94$; $P<0,0001$], apresentando os grupos CAF e CAF LOS maior acúmulo de gordura retroperitoneal comparado aos grupos CTL e CTL LOS. Nenhum efeito significativo para fármaco [$F(1;43)=1,670$; $P=0,2031$] ou

interação entre alimentação e fármaco [$F(1;43)=0,9695$; $P=0,3303$] foi observado no peso da gordura retroperitoneal, entre os grupos.

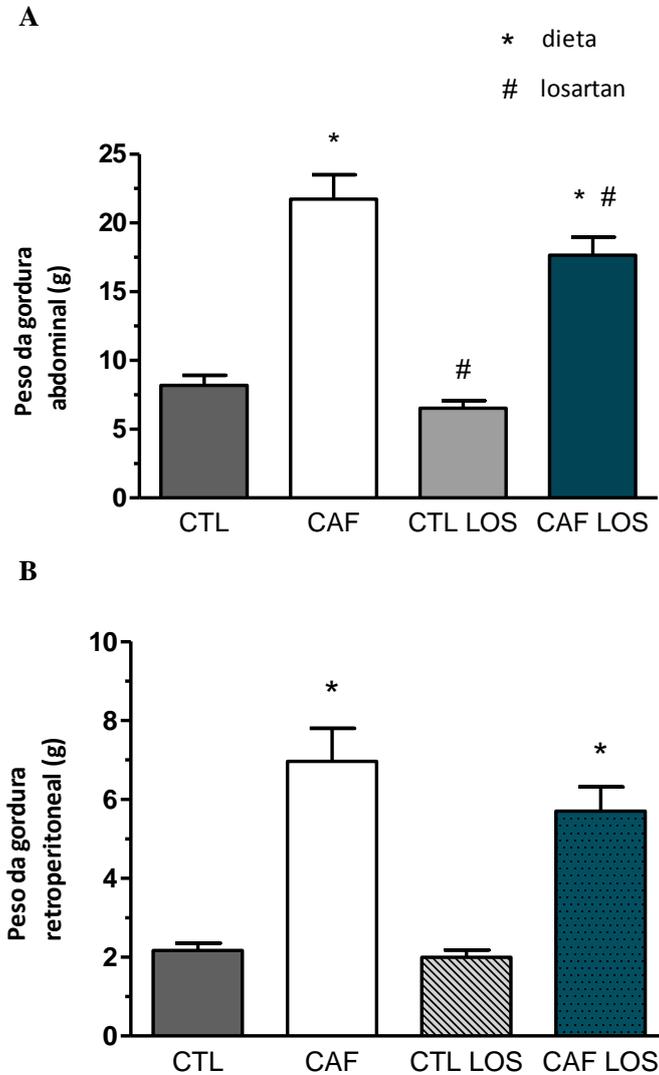


Figura 14. Peso das gorduras abdominal (A) e retroperitoneal (B) após 17 semanas de ingestão da dieta de cafeteria em associação com a administração de losartan. Resultados expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) dos grupos experimentais. ANOVA de duas vias. * representa diferenças significativas devido à dieta; # representa diferenças significativas devido ao losartan, em ambos considerando $P<0,05$.

Um significativo acréscimo na atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) foi verificado na manhã do estro no ovário de ratas do grupo CAF comparado ao grupo CTL, o efeito do tipo de alimentação foi significativo [$F(1;42)=30,32$; $P<0,0001$]. O bloqueio do receptor AT1 pelo fármaco Losartan nos animais que receberam apenas ração padrão promoveu pouca alteração na atividade da SOD. O mesmo bloqueio farmacológico quando

realizado no grupo CAF LOS impediu o aumento da atividade da enzima SOD ($P < 0,0001$). No grupo CAF LOS ocorreu inibição da atividade da SOD, evitando o aumento ocasionado em decorrência do consumo da dieta, nesses animais a enzima apresentou atividade semelhante ao grupo CTL LOS, sendo o efeito do fármaco significativo [$F(1;42)=22,41$; $P < 0,0001$]. Contatou-se interação entre o tipo de alimentação e o fármaco [$F(1;42)=5,426$; $P=0,0247$], o resultado está representado na figura 15.

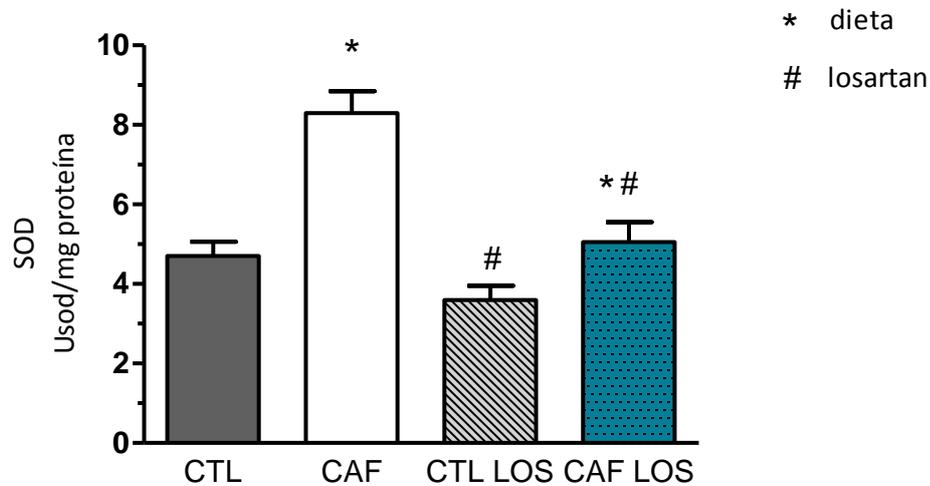


Figura 15. Atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) medida na manhã do estro no ovário de ratas adultas. Resultados expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) dos grupos controle (CTL), controle losartan (CTL LOS), cafeteria (CAF) e cafeteria losartan (CAF LOS). ANOVA de duas vias com pós-teste Bonferroni. * representa diferenças significativas devido à dieta; # representa diferenças significativas devido ao losartan, em ambos considerando $P < 0,05$.

A medida da atividade da enzima antioxidante catalase apresentou-se aumentada na manhã do estro no grupo CAF comparado ao grupo CTL ($P < 0,01$), entre os controles (CTL vs CTL LOS) nenhuma diferença significativa foi observada decorrente da administração do Losartan. No entanto, entre os grupos que consumiram a dieta de cafeteria o antagonista do receptor AT1 inibiu o acréscimo de atividade observado pela ingestão da dieta, o grupo CAF LOS tornou-se similar aos grupos CTL e CTL LOS ($P > 0,05$). Efeito significativo para o efeito da dieta foi encontrado [$F(1;43)=4,830$; $P=0,0334$], mas não para o efeito do losartan [$F(1;43)=3,557$; $P=0,0661$], e ocorreu interação entre as variáveis dieta e losartan [$F(1;43)=5,667$; $P=0,0218$], como mostra a figura 16.

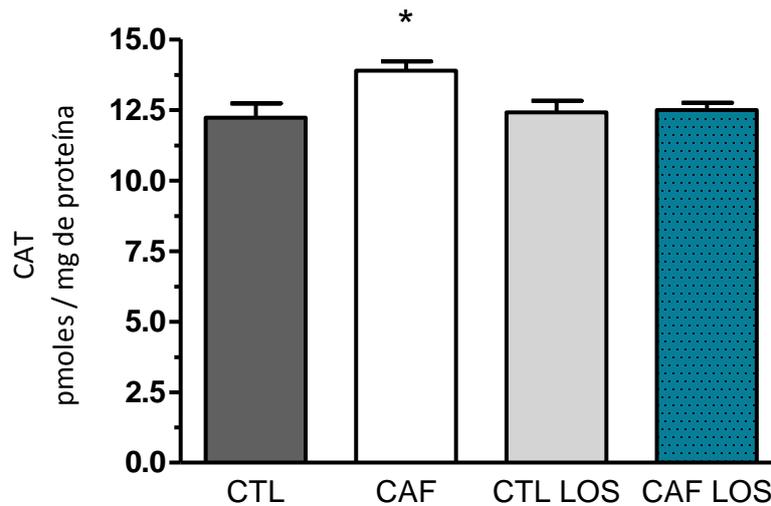


Figura 16. Medida da atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) na manhã do estro no ovário de ratas adultas. Resultados expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) dos grupos controle (CTL), controle losartan (CTL LOS), cafeteria (CAF) e cafeteria losartan (CAF LOS). ANOVA de duas. * representa diferenças significativas devido à dieta, considerando $P < 0,05$.

A Figura 17 mostra os dados relacionados à concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) medida nos ovários de ratas na manhã estro. O grupo CAF apresentou maior concentração de peróxido de hidrogênio quando comparado ao CTL ($P < 0,0001$), o efeito da dieta foi significativo na concentração [$F(1;36)=34,51$; $P < 0,0001$]. Quando administrado o losartan a concentração de peróxido no grupo CTL LOS foi maior comparado ao CTL, mas o aumento não é significativo. No grupo CAF LOS o losartan também não exerceu efeito significativo quanto à concentração de peróxido em relação ao grupo CAF, a concentração de H_2O_2 nesse grupo permaneceu elevada em comparação ao CTL LOS. Não se constatou interação entre o tipo de alimentação e o fármaco [$F(1;36)=3,649$; $P=0,0641$] e o efeito do fármaco não foi significativo [$F(1;36)=1,578$; $P=0,2171$].

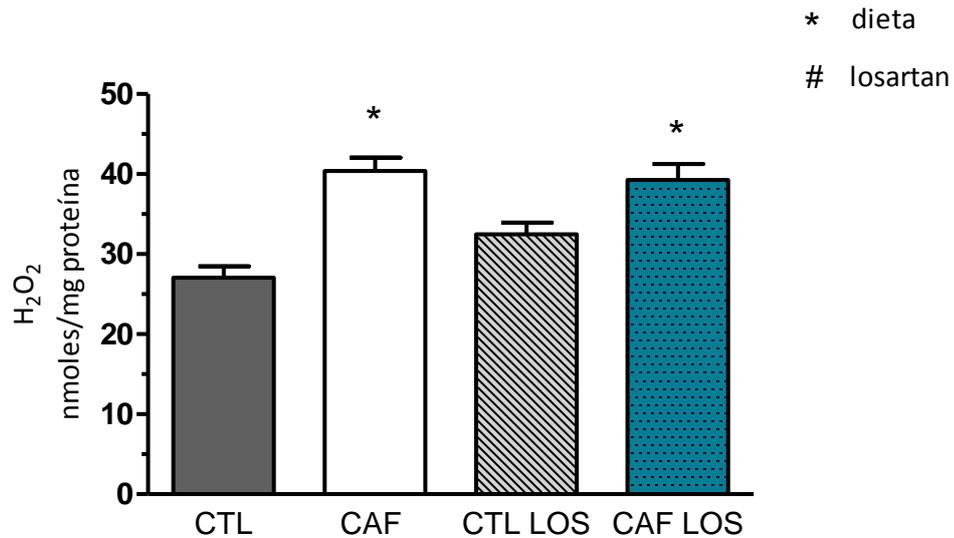


Figura 17. Concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) no ovário de ratas na manhã do estro. Resultados expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) dos grupos controle (CTL), controle losartan (CTL LOS), cafeteria (CAF) e cafeteria losartan (CAF LOS). ANOVA de duas vias. * representa diferenças significativas devido à dieta, considerando $P < 0,05$.

Não foi observada diferença na medida dos níveis de lipoperoxidação no ovário, na manhã do estro, entre o grupo que consumiu a dieta de cafeteria (CAF $26,98 \pm 2,294$) e o grupo controle que ingeriu apenas ração padrão e água durante todo o experimento (CTL $25,05 \pm 1,611$; $P=0,5485$). O bloqueio dos receptores AT1 da Ang II pela administração de Losartan não alterou os resultados nos grupos que receberam o antagonista (CAF LOS $23,98 \pm 1,873$; CTL LOS $28,01 \pm 2,627$). Os controles não diferem entre si (CTL vs CTL LOS, $P > 0,05$), nem os animais dos grupos cafeteria (CAF vs CAF LOS, $P > 0,05$). Nenhum efeito para tipo de alimentação [$F(1;35)=0,2292$; $P=0,6351$], fármaco [$F(1;35)=0,00007$; $P=0,9931$], ou interação entre os fatores [$F(1;35)=1,847$; $P=0,1829$] foi observado. A lipoperoxidação foi avaliada por meio de determinação de quimiluminescência, os dados constam na figura 18.

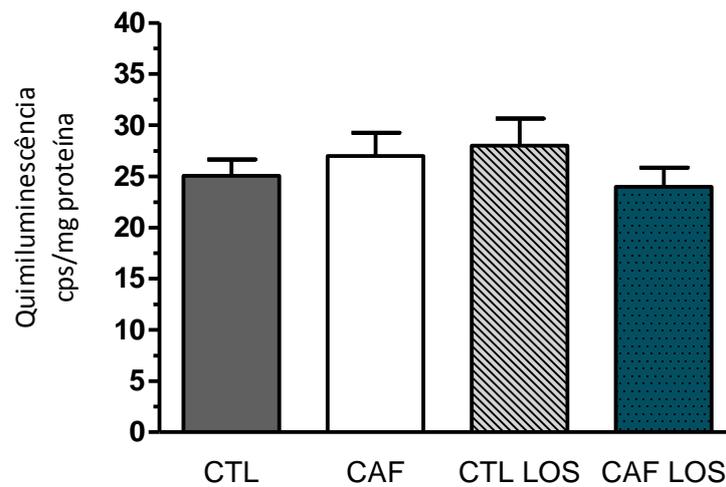


Figura 18. Medida dos níveis de lipoperoxidação no ovário, na manhã do estro, em ratas adultas. Resultados expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) dos grupos controle (CTL), controle losartan (CTL LOS), cafeteria (CAF) e cafeteria losartan (CAF LOS). ANOVA de duas vias. $P > 0,05$.

Avaliando a possibilidade de danos às proteínas, mediados por espécies reativas de oxigênio, em decorrência do consumo de dieta de cafeteria, nenhuma diferença estatística foi observada entre o grupo cafeteria (CAF $14,20 \pm 0,5735$) e o grupo controle (CTL $14,63 \pm 0,4199$) relacionada à formação de grupamentos carbonilas. O losartan não ocasionou diferenças significativas. Não ocorreu efeito significativo devido ao efeito da dieta [$F(1;32)=0,8969$; $P=0,3507$], o efeito do losartan não foi significativo [$F(1;32)=0,0447$; $P=0,8339$], nem interação das variáveis [$F(1;32)=2,956$; $P=0,952$]. A oxidação das proteínas foi medida por meio da medida de carbonilas plasmáticas, os resultados são apresentados na fig. 19.

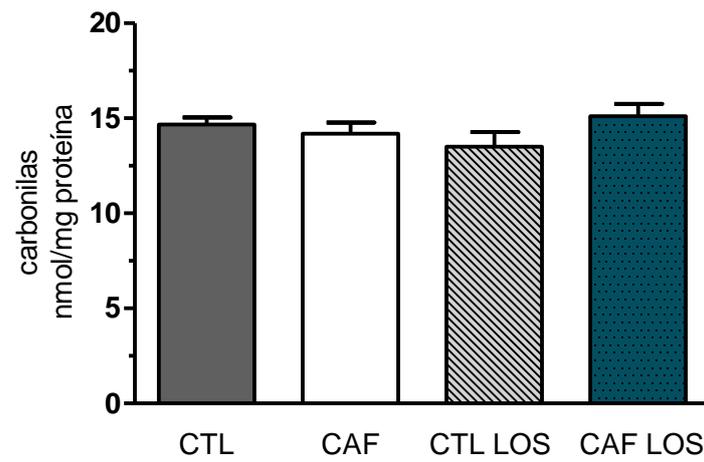


Figura 19. Medida da oxidação de proteínas através das carbonilas (nmol/ mg proteína) em plasma sanguíneo, avaliado na manhã do estro em ratas adultas. Resultados expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) dos grupos controle (CTL), controle losartan (CTL LOS), cafeteria (CAF) e cafeteria losartan (CAF LOS). ANOVA de duas vias. $P > 0,05$.

7. DISCUSSÃO

7.1. Experimento 1: Efeito da dieta da cafeteria associada a administração de losartan, introduzidos a partir do desmame, sobre a ovulação, a ingestão alimentar e hídrica.

A oferta da dieta de cafeteria associada à administração de losartan teve início a partir do desmame das fêmeas e permaneceu até a idade adulta, com duração total de 17^a semanas de experimento. A dieta de cafeteria foi utilizada para a indução da obesidade, pois reflete o padrão de obesidade observado em humanos, em que participam condições multifatoriais envolvendo a predisposição genética e o estilo de vida.

Ao avaliarmos a ingestão alimentar das fêmeas do grupo CAF, no período final do experimento, verificamos que a quantidade de energia total consumida foi elevada nos animais que receberam a dieta em relação ao controle. Quando analisamos os grupos tratados com losartan, durante a 17^a semana, notamos que a diferença entre a ingestão de energia total entre controles e cafeterias se manteve. No entanto, o fármaco diminuiu a ingestão alimentar levando os CAFLOS a uma menor ingestão energética total comparada aos CAF. Como a ingestão energética total inclui o refrigerante (no caso do consumo da dieta de cafeteria) analisamos separadamente a contribuição energética das calorias provenientes apenas de alimentos sólidos. A quantidade de energia consumida a partir de alimentos sólidos (ração padrão e sólidos palatáveis da dieta para o grupo CAF e CAFLOS) não difere entre os animais que receberam a dieta de cafeteria e os que consumiram apenas ração padrão, mas o consumo proveniente da ração padrão analisado isoladamente foi menor no grupo CAF quando ofertado com a dieta. Essa ingestão de ração padrão inferior pode ter sido consequência da alta palatabilidade dos alimentos sólidos e/ou do refrigerante que compõem a dieta de cafeteria, como ambos foram ofertados em conjunto não podemos concluir exatamente qual o fator responsável. O tratamento crônico com losartan modificou o comportamento alimentar, reduzindo a ingestão de alimentos palatáveis sólidos e de ração padrão. Interessantemente, a ingestão de alimentos sólidos que não foi diferente entre CAF e CTL, no CAFLOS tornou-se inferior ao consumo de sólidos pelos controles. Apesar da ingestão de energia de alimentos sólidos ter sido semelhante entre os CAF e CTL, a energia total ingerida foi superior devido à oferta da dieta de cafeteria. Provavelmente o resultado é devido ao consumo de refrigerantes por esses animais, visto que a bebida possui alta densidade energética, na ingestão de energia total consideramos o consumo da bebida. A ingestão líquida total no grupo cafeteria (representada por água e refrigerante nos grupos CAF e CAFLOS) foi elevada em

comparação aos controles. O tratamento crônico com losartan inibiu a ingestão líquida no grupo que consumiu ração padrão, enquanto no grupo que recebeu a dieta associada à ração padrão observamos o contrário, esse grupo apresentou o maior consumo líquido total. Mas considerando o consumo isolado de água no mesmo período do experimento, a ingestão foi reduzida acentuadamente em ambos os grupos que receberam o antagonista do receptor AT1 da Ang II, portanto o losartan inibiu o consumo apenas de água. As fêmeas da cafeteria que já apresentavam um menor consumo de água que os controles reduziram ainda mais a sua ingestão com a associação do fármaco. A explicação para a redução da ingestão de água em ambos os grupos que receberam o losartan deve-se ao efeito anti-dipsogênico do fármaco. A Ang II central está envolvido em respostas comportamentais e endócrinas, importantes na regulação do equilíbrio de líquido corporal, incluindo a ingestão de água, entre outras funções. Através do receptor AT1 a ligação da Ang II ao receptor desencadeia uma resposta dipsogênica o que induz a sede (Davisson et al., 2000; Saavedra et al., 2004). Em várias regiões centrais incluindo o órgão subfornicial (OSF), órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT) e área postrema (AP), que participam do controle da sede, a ausência de barreira sangue-cérebro possibilita o acesso da Ang II proveniente da circulação periférica (Fitzsimons, 1998; Rouch & Schimid, 1999) e assim o efeito dipsogênico do peptídeo. Em conjunto essas regiões são conhecidas por órgãos circunventriculares (OCVS) e localizam-se na parede anterior do terceiro ventrículo (*lamina terminalis*). A lâmina terminal na área frontal do cérebro é um local de geração da sede, onde se encontram osmorreceptores dentro do OVLT e do OSF (McKinley et al., 2006). Situado longitudinalmente na lâmina terminal entre a porção dorsal do OVLT e a periferia do OSF encontra-se o núcleo mediano pré-óptico (MnPO) que também está envolvido no controle da sede, esse núcleo é parte integrante da região antero ventral do terceiro ventrículo e, apesar de não responder diretamente a Ang II circulante, é ativado por estímulos osmóticos e hormonais (como a Ang II) transmitidos através de sinais neurais do SFO e, possivelmente, do OVLT (McKinley & Johnson, 2004). Devido à presença de receptores da Ang II os OCVS podem detectar as variações na concentração de Ang II circulante. Na dose de 10mg/kg de peso corporal o losartan consegue cruzar a barreira sangue-cérebro através dos OCVs e reduzir o efeito dipsogênico da Ang II, seja ela de origem central ou periférica (Polidori et al., 1996; 1998), resultando em menor consumo de água. Nossos resultados mostram que o receptor AT1 do SRA central foi bloqueado por meio da administração crônica do fármaco losartan, pois ocorreu inibição da ingestão de água em ambos os grupos tratados com o antagonista. O efeito anti-dipsogênico

permaneceu durante todo o experimento, como mostrado na figura de evolução da ingestão de água, essa observação assegura que a dose utilizada no estudo foi bem administrada.

Apesar da ingestão de água ter sido reduzida no grupo CAFLOS em comparação ao CAF, a ingestão líquida total foi elevada e acima do volume de líquido consumido pelo grupo controle. O acentuado consumo de líquidos pelos animais dos grupos que receberam a dieta foi devido à ingestão de refrigerante, pois esses animais ingeriram menos água e apresentaram uma ingestão total superior aos controles. Comparando o consumo de refrigerante entre os grupos cafeterias podemos perceber que o grupo CAFLOS losartan apresentou aumento do consumo da bebida. Estudos comparando o consumo de água e soluções salinas demonstram que o losartan bloqueia o efeito da Ang II sobre a indução da sede sem alterar o consumo de salina, dando suporte a hipótese que a Ang II induz o consumo de água e outros aportes hídricos por vias distintas (Vento & Daniels, 2010). Os resultados deste estudo sugerem que o consumo de água e outros aportes hídricos sejam regulados por vias distintas, o que explicaria o efeito oposto do bloqueio do receptor AT1 sobre a ingestão de refrigerantes em comparação ao consumo de água.

Durante o período de 17 semanas de estudo, os grupos experimentais tiveram livre acesso aos alimentos e líquido ofertados, a consequência do consumo da dieta de cafeteria em associação à ração padrão e água foi uma redução na ingestão de proteínas, aumento do consumo de carboidratos e lipídeos e aproximadamente o dobro da ingestão de sódio em comparação ao padrão alimentar das fêmeas do grupo controle. Em outros trabalhos a ingestão de dieta de cafeteria foi associada ao aumento do consumo de lipídeos, sem diferenças no consumo proteínas e carboidratos em relação ao grupo controle após 15 semanas de intervenção (Martire et al., 2013). Essa diferença quanto ao padrão de ingestão poderia ser atribuída à alta ingestão de refrigerante, pois nos estudos anteriores não constava a bebida como item da dieta, mas também poderia ser atribuída a diferenças nos tipos de alimentos que compõem a dieta, pois os itens alimentares variam entre diferentes grupos de pesquisa. A reduzida ingestão de ração padrão nos grupos cafeteria pode ter contribuído, junto com os fatores citados, para o menor consumo de proteínas, pois a ração é uma fonte rica em proteínas para esses animais. O padrão alimentar das fêmeas do grupo CAF, caracterizado por elevado consumo de refrigerante somado à preferência por ingestão de alimentos sólidos palatáveis de baixo valor nutricional, porém de alta densidade energética resultou em maior ingestão energética total. O losartan não alterou o padrão alimentar nas fêmeas do grupo CTL LOS, no entanto, no grupo CAFLOS a administração do antagonista resultou em menor consumo em gramas de carboidratos comparado ao grupo CAF. Interessante neste modelo de

indução da obesidade a contribuição do refrigerante para o consumo energético total, como a ingestão de energia a partir de alimentos sólidos não difere entre CAF e CTL, o consumo da bebida foi responsável por uma elevada ingestão de energia total no grupo cafeteria.

Roedores, machos e fêmeas, submetidos ao consumo de refrigerante de cola em conjunto com água e ração padrão, reduzem ingestão de água, enquanto o consumo total de líquidos aumenta acentuadamente devido a ingestão da bebida, porém sem alteração significativa na ingestão de ração padrão (Ogur et al., 2007). Mas já foi demonstrado redução no consumo de ração padrão a 50% quando ofertado refrigerante de cola ao invés de água, e elevado consumo da bebida comparado ao consumo de água (Garcia-Contreras et al., 2000), entretanto nesse estudo refrigerante e água foram fornecidos separadamente de maneira que os animais não tiveram livre escolha. Quando ofertado a roedores a dieta de cafeteria sem o refrigerante ou bebidas adoçadas, o consumo de ração padrão é reduzido e a preferência por alimentos da dieta resulta em maior aporte energético (Martire et al., 2013). O acesso à dieta de cafeteria faz com que os animais consumam quase que exclusivamente a dieta, conseqüentemente uma pequena fração na sua ingestão energética total provem do consumo de ração padrão, por 40 dias de experimento a preferência por alimentos palatáveis da dieta contra a ração padrão manteve-se elevada (Johnson & Kenny, 2010; Goulart et al., 2012). A ingestão de bebidas adoçadas reduz o consumo de alimentos sólidos em ratas e promove maior ingestão de energia total (Light et al., 2009). Uma proporção significativa do consumo de energia total pode ser atribuída ao consumo de bebidas adoçadas como os refrigerantes de cola (Pereira, 2006). Nossos resultados mostraram que o consumo de refrigerante foi responsável por uma alta ingestão de energia total nas fêmeas submetidas à dieta de cafeteria. Com base em outros estudos e nos resultados encontrados no presente trabalho, sugerimos que tanto a ingestão de alimentos palatáveis (sólidos) da dieta de cafeteria quanto à ingestão de refrigerante de cola tenham influenciado o comportamento alimentar dos grupos cafeteria em relação à ingestão de ração padrão, resultando em redução da ingestão desse tipo de alimento.

O elevado consumo de refrigerante pelos grupos cafeteria neste estudo, o que resultou em maior ingestão líquida total, parece estar associado à alta palatabilidade da bebida, e não ser consequência de uma elevada ingestão de sódio por esses animais. Pois aumentos acentuados no consumo de refrigerante foram verificados em ratos que consumiam ração padrão (Ogur et al., 2007), independente de maior ingestão de sódio. E elevada ingestão da bebida acompanhada de reduzido consumo de alimentos sólidos, e conseqüentemente, de redução na ingestão de sódio (Milei et al., 2011; Otero-Losada et al., 2011). Isso indica que os

animais consomem a bebida em excesso devido a outros mecanismos regulatórios e não apenas por um mecanismo de controle da sede. É possível que o consumo elevado de refrigerante tenha sido resultado de mecanismos de recompensa encefálicos. Estudos mostram que a ingestão de soluções de sacarose provoca um aumento dependente de concentração nos níveis extracelulares de dopamina no núcleo accumbens (Hajnal & Norgren, 2001; Hajnal et al., 2004), essa liberação estaria envolvida em um processo de recompensa no cérebro em resposta a ingestão de sacarose, por intermediação do sistema límbico (Norgren et al., 2006). Em ratos a livre escolha entre alimentos palatáveis e solução de sacarose concomitante com a oferta de ração padrão aumenta a motivação por alimentação, induzindo adiposidade e quando os animais se tornam obesos a motivação por alimentos saborosos é acentuada, indicando haver um efeito do peso corporal sobre o comportamento alimentar motivado (La Fleur et al., 2007). Esta tendência por consumo de alimentos palatáveis em quantidades que excedem os requisitos de energia tem sido associada a um processo semelhante à dependência, o que poderia estar relacionado a alterações nos circuitos de recompensa no cérebro, semelhantes aos observados em processos de dependência por drogas (Pandit et al., 2012). Ofertamos a dieta de cafeteria por 17 semanas, portanto os animais estiveram expostos por longo tempo aos itens da dieta. Alsiö e colaboradores (2010) mostraram em roedores que a exposição por tempo prolongado a alimentos palatáveis resulta em modificações do sistema dopaminérgico por alterar a expressão de receptores de dopamina do tipo D2 no núcleo accumbens, isso justificaria a propensão a comer em excesso. Em indivíduos obesos também foi verificada redução na disponibilidade de receptores D2 no estriado, onde se encontra o núcleo accumbens, assim a baixa atividade de dopamina no cérebro poderia predispor ao consumo excessivo de alimentos (Wang et al., 2002), como observado em estudos com roedores. Também podemos considerar o fato que os estímulos de paladar se relacionam com o sistema de recompensa encefálico por meio do núcleo parabraquial pontino (PBN), um centro gustativo no rato, influenciando a ingestão de alimentos e a regulação do peso corporal; alterações no código gustativo no PBN e a consequente redução de sensibilidade de neurônios relacionados ao estímulo poderiam explicar a avidez por doce, tornando necessárias concentrações mais elevadas para produzir aumento da resposta de recompensa no cérebro (Kovacs & Hajnal, 2008). Nosso estudo mostra que a preferência por alimentos palatáveis da dieta de cafeteria e por refrigerante resultou em reduzido consumo de ração padrão, provavelmente esse alimento resulte em menor ativação de sistemas de recompensa encefálico por ser menos palatável em comparação à dieta.

O hipotálamo é o principal sítio de regulação da ingestão de alimentos e do peso corporal. Em áreas específicas, núcleo arqueado e paraventricular, neurônios peptidérgicos respondem a sinais periféricos secretando orexígenos e anorexígenos, que por sua vez atuam na regulação da homeostase de energia e alimentação (Leibowitz & Wortley, 2004). Estudos experimentais relatam a participação da Ang II no controle do comportamento alimentar, sugerindo uma nova via na regulação da ingestão de nutrientes (Brink et al., 1996; Ohinta et al., 2008; Yoshida et al., 2012). Nossos resultados indicam um efeito da Ang II na ingestão de alimentos, o que foi evidenciado por meio do bloqueio do receptor AT1 com consequente diminuição da ingestão energética. No entanto os efeitos do antagonista são mais acentuados quando os animais estão expostos a um ambiente “obesogênico” como no caso da oferta da dieta de cafeteria, sugerindo um efeito preventivo sobre a ingestão excessiva de nutrientes na obesidade. Foi constatado em um modelo animal de obesidade que o tratamento com Telmisartan previne a ingestão de alimentos em excesso (Aubert et al., 2010). Nós relatamos que a administração crônica de Losartan, um antagonista das ações da Ang II no receptor AT1, na água de beber reduziu a ingestão energética total no grupo CAFLOS, mas no grupo CTLLOS a redução não foi significativa e a diferença entre os grupos manteve-se independente do antagonista. Ao analisarmos a ingestão energética somente de alimentos sólidos os efeitos do bloqueio do receptor AT1 são ainda mais evidentes, ocasionando diminuição da ingestão energética de sólidos no grupo CAFLOS, o qual apresentou um consumo inferior ao grupo CTLLOS. O dado sugere que se existisse um terceiro grupo cafeteria associado ao antagonista AT1, mas sem a oferta de refrigerante, poderia ser ocasionada uma redução mais proeminente da ingestão energética total, pois na energia total consideramos o consumo de refrigerante. A redução do consumo energético no CAFLOS foi acompanhada por uma diminuição significativa no aporte em gramas de carboidratos, lipídeos e proteínas também foram consumidas em menor quantidade, porém sem diferença significativa. No cérebro o SRA é um importante regulador da pressão sanguínea e do consumo de líquidos, mas também tem sido atribuída sua participação na regulação do metabolismo e na função reprodutiva. No SRA central as vias eferentes que regulam a pressão arterial e o efeito dipsinogênico parecem ser distintas da regulação dos efeitos metabólicos, sendo os primeiros dependentes do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, o qual por sua vez depende da interação entre o SRA central e o SRA sistêmico (Sigmund et al., 2012). A angiotensina II é o efetor primário do SRA, e tem sido relacionada ao consumo de alimentos em roedores (Brink et al., 1996; 2001; Yoshida et al., 2012). Administrada ICV a Ang II dependente da dose afeta a ingestão de alimentos, porém as atividades anorexígenas são

inibidas com o uso de antagonistas do AT2 e em ratos “knockout” para o AT2, em menor efeito ratos “knockout” para AT1 apresentam redução da ingestão, o que estaria indicando uma nova via para regulação da ingestão alimentar, na qual a Ang II atuaria suprimindo a ingestão via AT2 e com envolvimento parcial do AT1 (Ohinta et al., 2008). A infusão periférica de Ang II está relacionada com a diminuição do consumo de alimentos em roedores (Brink et al., 1996), e o uso de Ibesartan um antagonista do receptor AT1 foi associado à redução da ingestão alimentar em curto prazo (Voigt et al., 2007). Porém, o bloqueio do receptor AT1 com Telmisartan, na dose de 5mg/kg na água de beber por 14 dias, se mostrou ineficaz em alterar a ingestão de alimentos, mas com efeitos significativos sobre o metabolismo por meio da atenuação do ganho de peso, redução da massa adiposa visceral e melhora da hiperinsulinemia (Araki et al., 2006), no entanto o estudo envolvia a indução de obesidade. Camundongos “Knockout” para o AT1 se tornam hiperfágicos quando submetidos à dieta *ad libitum*, sugerindo um mecanismo mediado por meio do SRA para evitar a ingestão de alimentos (Yamamoto et al., 2011). Entretanto, em camundongos, administrações subcutâneas de Olmesartan um bloqueador do AT1 não afetam o peso corporal nem a ingestão de alimentos, enquanto a administração ICV aumenta a ingestão de alimentos, indicando que a administração periférica não seria suficiente para inibir o sinal do AT1 no PVN (Yamamoto et al., 2011). Para elucidar a associação da atividade prolongada do SRA com alterações na ingestão de alimentos, demonstrou-se que ratos transgênicos para renina apresentam elevações da Ang II, nas regiões cerebrais envolvidas na regulação do equilíbrio hídrico corporal, desencadeando maior ingestão de alimentos (Szczepánska-Sadowska et al., 2003), contrário ao efeito observado com suplementação do SRA por meio de infusões periféricas e centrais de Ang II.

Existe uma divergência nos resultados expostos por diferentes pesquisas sobre o efeito da Ang II na ingestão alimentar, o que dificulta o entendimento do assunto. Seus efeitos sobre a regulação do apetite são muito mal compreendidos (Yamamoto et al., 2011; Yoshida et al., 2012). A hipótese de que o SRA no cérebro funcione em oposição ao SRA periférico poderia explicar os efeitos paradoxalmente similares da suplementação do SRA, por meio de uma infusão de Ang II, ou inibição, pelo uso de bloqueadores do AT1 observados em diferentes estudos (Grobe et al., 2013), mas não esclarece os efeitos contrários mediante a mesma intervenção. Sugerimos que a redução da ingestão alimentar mediante o bloqueio do receptor AT1, por meio da administração crônica de Losartan, poderia estar disponibilizando mais Ang II para ligar no hipotálamo ao receptor AT2, ao qual tem sido atribuída uma resposta anorexígena por alguns autores. Mas não descartamos a possibilidade do bloqueio do

receptor AT1 ao promover melhoras no metabolismo, devido à existência do SRA no tecido adiposo, possa contribuir para uma sinalização ao hipotálamo mais adequada no controle do comportamento alimentar. Em conjunto as ações periféricas e centrais da Ang II somadas ao bloqueio do receptor AT1 poderiam estar contribuindo para uma melhora geral do organismo durante o ganho de peso induzido por dieta.

As respostas ao estado nutricional do organismo estão em estreita relação com os níveis dos hormônios leptina e insulina, entre outros (Leibowitz & Wortley, 2004). Além das ações metabólicas, a insulina possui ações reprodutivas. Portanto, avaliamos o efeito da dieta de cafeteria sobre a concentração de insulina e a possível modulação do SRA sobre a concentração deste hormônio. Após 17 semanas de intervenção as ratas que receberam a dieta de cafeteria apresentaram hiperinsulinemia de jejum, verificada por uma concentração de insulina três vezes mais elevada em relação ao controle. Nossos dados estão de acordo com estudos publicados por outros grupos de pesquisa. Já foi demonstrado que animais alimentados com dieta rica em gordura por 16 semanas apresentam concentrações de insulina elevadas em comparação ao controle alimentado com ração, mas com glicemia de jejum semelhante (Sishi et al., 2011). Em ratos *wistar* tratados com dieta de cafeteria por 17 semanas verificou-se aumento de secreção de insulina pelas células β pancreáticas, estando nessa situação relacionado a um estado pré-diabético (Castell-Auri et al., 2012). Como não dosamos a glicemia de jejum nenhuma observação quanto à alteração de glicemia ou a respeito da possibilidade de resistência à insulina poderia ser argumentada. No entanto, estudos utilizando um modelo animal de obesidade, induzida por dieta, com um tempo de intervenção similar ou por períodos mais longos, demonstram que os animais não apresentam hiperglicemia, pois de forma compensatória ocorre aumento nos níveis circulantes de insulina o que contrapõem a reduzida ação do hormônio e possibilita manter o estado normoglicêmico (Padra et al., 2005; Sampey et al., 2011; Goulart et al., 2012). O bloqueio do receptor AT1 pelo fármaco losartan quando associado à oferta da dieta de cafeteria minimizou os efeitos da ingestão da dieta sobre a insulinemia, promovendo nessas ratas uma significativa redução da concentração plasmática em comparação ao grupo CAF. No entanto, a administração crônica do fármaco não foi capaz de impedir que essas ratas apresentassem um aumento da insulinemia de jejum quando comparado aos controles. O grupo CAFLOS manteve a hiperinsulinemia. O mesmo bloqueio do receptor AT1 em animais alimentados apenas com ração padrão não afetou significativamente a concentração do hormônio. Provavelmente essa observação seja devido ao fato de que alterações do SRA estão associadas à obesidade e desordens metabólicas, assim o bloqueio do receptor AT1 poderia prevenir ou minimizar os

efeitos desencadeados pela ingestão de alimentos que usualmente estão associados ao ganho excessivo de peso corporal e adiposidade. Em modelos animais a deleção de componentes do SRA protege contra o desenvolvimento da obesidade e desordens metabólicas induzidas por dieta (Massiera et al., 2001). Também se demonstrou que ao silenciar genes de componentes do SRA a produção de angiotensinogênio pelos adipócitos é diminuída, resultando em menor acúmulo de lipídeos e produção de citocinas inflamatórias (Carroll et al., 2013). Em ratos com deficiência de angiotensinogênio, necessário para formação de angiotensina, ocorre redução da resistência à insulina induzida por dieta (Kouyama et al., 2005). Ao contrário, a superexpressão de angiotensinogênio no tecido adiposo de camundongos transgênicos resulta em adiposidade, hipertrofia de adipócitos, inflamação e resistência à insulina (Kalupahana et al., 2012). Independente do bloqueio do SRA ser realizado por antagonistas do receptor AT1 ou por inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), as intervenções estão sendo estudadas na tentativa de elucidar o papel modulador do SRA nas alterações metabólicas associadas à obesidade. A participação do SRA no modelo animal de diabetes, induzida por estreptozotocina e dieta de alto teor de gordura por longo período de intervenção, foi investigada por meio do bloqueio do receptor AT1 com o fármaco Telmisartan resultando em retardo do desenvolvimento de diabetes com a redução da atividade do SRA (Li et al., 2012). Como o tecido adiposo está inversamente correlacionado com a sensibilidade à insulina, sugere-se que o bloqueio do SRA melhoraria a sensibilidade ao hormônio por aumentar a formação de adipócitos (por diferenciação de pré-adipócitos), o que evitaria a deposição ectópica de lipídeos em outros tecidos como músculo, fígado e pâncreas que são sensíveis às ações da insulina (Sharma et al., 2002). Essa seria uma hipótese a se considerar, pois diversos trabalhos têm sugerido a participação do SRA no desenvolvimento do tecido adiposo por meio da ação da Ang II nos receptores AT1 e AT2 (Cooper et al., 1997; Safonova et al., 1997; Massiera et al., 2001; Giacchetti et al., 2002; Strazzullo et al. 2004; Cassis et al., 2008). A melhora da concentração de insulina nas ratas que tiveram acesso a dieta de cafeteria em associação a administração de losartan pode ter sido consequência tanto da menor ingestão energética total e modificação do padrão alimentar decorrentes da administração crônica de losartan, pois o consumo de carboidratos foi reduzido com o bloqueio do AT1, como devido a uma redução de tecido adiposo abdominal (visceral) por meio do bloqueio do receptor AT1 e uma melhora da sensibilidade à insulina nos tecidos alvos.

A adiposidade pode alterar o balanço entre a disponibilidade de estrogênios e androgênios, modificando a disponibilidade de esteroides sexuais circulantes, por alterar as concentrações plasmáticas da SHBG, essas modificações podem resultar em disfunção do

eixo hipotálamo-hipófise-gonadas (HHG) e ocasionar prejuízo à função reprodutiva. As ações periféricas e centrais de hormônios, adipocinas e citocinas pró-inflamatórias liberadas pelo tecido adiposo podem inibir a atividade do eixo HHG em vários níveis de regulação. A insulina é um hormônio conhecido por seus efeitos sobre a homeostase energética, mas também apresenta um papel importante na função ovariana (Gamba & Pralong, 2006; Salvi et al., 2006). Em obesos a hiperinsulinemia é usualmente associadas à resistência insulínica e diabetes, mas também parece estar associada com alterações reprodutivas em obesos (Pasquali, 2006).

Contrário a estudos anteriores que indicam uma redução significativa no número de oócitos liberados por ratas com obesidade induzida por consumo da dieta de cafeteria (Sagae et al., 2012), nossos resultados não apresentaram diferença estatística significativa. No entanto, não podemos desconsiderar o fenômeno biológico observado, pois as fêmeas do grupo CAF apresentaram aproximadamente 50% de redução na ovulação. Ao realizarmos o pós-teste (Bonferroni) a diferença é significativa considerando um valor de $P < 0,005$, mas por hierarquia manteve-se o resultado do teste Anova de duas vias. O número de oócitos evidenciado no grupo controle está em conformidade com a literatura. Ratas com ciclo estral regular, geralmente, apresentam uma ovulação com um número entre 10 e 14 oócitos a cada ciclo na manhã do estro (Gomes et al., 1999). A administração do losartan parece reduzir o número de oócitos no grupo CTLLOS e minimizar a diferença no grupo CAFLOS, entretanto, essas diferenças não são estatisticamente significativas. Estudos anteriores demonstraram uma inibição da ovulação associada à administração de antagonistas da Ang II em ovários de ratas perfundidos (Mikuni et al., 1998), e em ovários de coelhas (Yoshimura et al., 1992). No entanto, o bloqueio do receptor AT1 pelo Losartan não afeta a ovulação em ovários perfundidos de ratas (Mitsube et al., 2003). Em conformidade com nosso resultado, o bloqueio do receptor AT1 de Ang II não alterou o número de oócitos em ratas controles (Segae et al., 2013). Apesar da obesidade, neste modelo experimental, não ter alterado a ovulação, outro aspecto reprodutivo que não analisamos nesse estudo poderia ser questionado, e refere-se à qualidade dos oócitos liberados. Em fêmeas de camundongos, após 16 semanas de dieta rica em gordura, os folículos ovarianos são significativamente mais apoptóticos e os oócitos menores comparados às fêmeas não obesas (Luzzo et al., 2012). A obesidade prejudica a qualidade dos oócitos, em modelo de obesidade animal, além disso, ocasiona atraso da maturação meiótica, aumento de apoptose folicular e redução no tamanho dos oócitos, (Jungheim et al., 2010).

7.2. Experimento 2: Efeito da dieta de cafeteria associada a administração de losartan, introduzidos a partir do desmame, sobre parâmetros oxidativos medidos na manhã do estro no ovário de ratas.

A oferta da dieta de cafeteria a partir do desmame ocasionou uma alta ingestão de alimentos palatáveis, com isso a ingestão de gordura e lipídeos foi acentuada, resultando em maior consumo de energia, conforme discutido no primeiro experimento. Esse padrão alimentar influenciou de maneira significativa o aumento de peso, o que refletiu sobre a distribuição de gordura corporal após 17 semanas de experimento, mas sem alterar o peso ovariano. As ratas do grupo CAF desenvolveram um acúmulo de gordura abdominal e retroperitoneal, aproximadamente, duas vezes mais elevado que as ratas do grupo controle. Semelhante aos resultados apresentados, a elevada ingestão de energia proveniente do consumo da dieta de cafeteria resulta em aumento de peso corporal (Shafat et al., 2009; Martire et al., 2013). Diferentes estudos utilizando dietas semelhantes à típica dieta ocidental dos Humanos, composta por alimentos palatáveis com conteúdos elevados de carboidratos e gorduras, semelhante à utilizada no presente estudo, reproduzem com sucesso desfechos metabólicos, produzindo obesidade, aumento da concentração de insulina no plasma e adiposidade visceral (Naim et al., 1985; Sishi et al., 2011), como evidenciado em nossos resultados. O consumo da dieta de cafeteria por 35 dias promove acréscimos de peso corporal comparado a animais tratados com dieta balanceada (Colombo, 2012). Porém com apenas 15 dias de consumo da dieta os animais já apresentam adiposidade visceral (Rodriguez *et al.*, 2012), demonstrando que independente da alteração no peso corporal o consumo de alimentos ricos em carboidratos e lipídeos afetam a distribuição de gordura corporal. O bloqueio do receptor AT1 da Ang II reduziu a adiposidade visceral nos grupos que receberam o losartan, prevenindo o acúmulo de gordura abdominal, mas não da gordura retroperitoneal. Isto sugere a existência de uma modulação do SRA, através da ação da Ang II, sobre o desenvolvimento do tecido adiposo, em particular da adiposidade visceral. Em obesos humanos ou animais os componentes do SRA encontram-se elevados tanto na circulação quanto no tecido adiposo (Engeli et al., 2005), e a expressão do receptor AT1 é maior no tecido adiposo visceral (Giacchetti et al., 2002). Considerando que a Ang II está envolvida na regulação do crescimento e diferenciação dos adipócitos (Giacchetti et al., 2002), é possível que o bloqueio do receptor AT1 tenha reduzido o acúmulo de lipídeos nos adipócitos, e promovido uma redução do acúmulo de gordura abdominal. Isto pode ser devido à participação do SRA em condições nas quais este padrão de deposição de gordura está presente. Embora a menor massa adiposa abdominal, os grupos CTLLOS e CAFLOS não apresentaram diferença

significativa no peso corporal final, em relação aos grupos que receberam respectivamente o mesmo tipo de alimentação, porém sem o fármaco na água de beber, é possível que tenha ocorrido uma melhor eficiência na distribuição dos substratos energéticos, favorável a um maior desenvolvimento de massa magra com o bloqueio do AT1. Todavia teríamos que avaliar o ganho de massa magra para poder realizar afirmações.

Várias pesquisas têm indicado que condições de excesso de peso, tal como a obesidade, estão associadas a uma disfunção reprodutiva em fêmeas de roedores e humanos (Wu et al., 2012; Ehrmann, 2005; Akamine et al., 2010; Brothers et al., 2010); e com o aumento da obesidade a resposta do eixo reprodutivo ao consumo de nutrientes em excesso têm recebido mais atenção. A infertilidade está associada a doenças como diabetes, síndrome metabólica e síndrome do ovário policístico (PCO), condições que são marcadas por obesidade e um fenótipo metabólico que inclui hiperinsulinemia, hiperleptinemia, bem como resistências à insulina e leptina (Ehrmann, 2005); também têm sido descrito que muitas das condições relacionadas à infertilidade, como endometriose, PCO, aborto espontâneo e resultados negativos após técnicas de reprodução assistida, estão associadas com o estresse oxidativo (Kuşçu & Var, 2009). Apesar das ERO estarem relacionadas com processos patológicos que envolvem o trato reprodutivo, existe uma série de funções reprodutivas influenciadas por ERO, essas espécies são importantes para as vias de sinalização em processos fisiológicos (Sugino et al., 2000), e estão envolvidas na maturação do oócito (Riley & Behrman, 1991), luteólise (Sugino et al., 2000), produção de progesterona pelo corpo lúteo (Sugino et al., 1993; Sawada & Carlson, 1996) e ovulação (Shinamura et al., 1995; Fujji et al., 2005), desempenhando um papel essencial na função reprodutiva.

Uma das fontes geradoras de ERO, durante os eventos fisiológicos que resultam na ovulação, inclui o complexo enzimático NADPH oxidase presente nos folículos ovarianos (Griendling & Ushio-Fukai, 2000; Kodman & Behrman, 2001). Griendling e colaboradores (1994) descobriram que a Ang II ativa a NADPH oxidase no músculo liso vascular, uma importante fonte de ERO. No SNC a Ang II também induz a formação de ERO por meio da ativação da NADPH oxidase (Peng, 2013), assim o SRA local é um mediador da formação de ERO (Lassígue & Clempus, 2003); no tecido cardíaco o uso de antagonista do receptor AT1 é capaz de atenuar os efeitos patológicos decorrentes do estresse oxidativo, demonstrando uma contribuição do SRA para a geração de ERO (Wu B, 2013). Sabe-se que o peptídeo Ang II estimula a NADPH oxidase produzindo $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 como um mecanismo de sinalização celular durante a transdução de sinal do receptor AT1, em outros tecidos (Touyz et al., 2004). O tecido ovariano passa por modificações hemodinâmicas que estão envolvidas no seu

remodelamento cíclico, essas alterações ocorrem durante os eventos de crescimento folicular, ovulação, formação e regressão do corpo lúteo (Acosta et al., 2002). A ovulação é resultado da interação entre o aumento pré-ovulatório de LH e fatores produzidos localmente, como hormônios esteroides e peptídeos, o que desencadeia alterações estruturais e bioquímicas necessárias à ruptura do folículo para a liberação do oócito (Acosta & Miyamoto, 2004). Em ovário de bovinos, a Ang II é mediadora da hiperemia nos folículos pré-ovulatórios em resposta ao estímulo do LH (Acosta et al., 1999). Na circulação sistêmica a Ang II é um peptídeo vasoativo que modula o tônus vascular, sendo assim foi proposto que tenha envolvimento nas mudanças locais de fluxo sanguíneo no interior do ovário (Acosta & Miyamoto, 2004). Anteriormente foi constatado que a Ang II atua modulando os processos reprodutivos no ovário (Yoshimura, 1997), e modifica tanto a síntese quanto a secreção de hormônios produzidos por células esteroidogênicas de maneira autócrina e parácrina (Yoshimura et al., 1993), os receptores para o peptídeo foram identificados nos folículos ovarianos (Husain et al., 1987). Em conjunto essas observações nos sugerem a participação da Ang II na geração de ERO no ovário. É importante considerar os efeitos benéficos das ERO em condições fisiológicas, mas elevações podem interromper a maturação de oócitos (Liu et al., 2000), demonstrando que oócitos de mamíferos são sensíveis ao estado redox. Neste estudo, demonstramos que a obesidade afeta a ovulação ao ocasionar a diminuição do número de oócitos liberados na manhã do estro. O estresse oxidativo está associado à diminuição da fertilidade feminina. No entanto, o papel das ERO na fertilidade é muito pouco estudado (Ruder et al., 2009), e não foram definidos valores de referência para concentrações fisiológicas de ERO na reprodução feminina (Argawal et al., 2005), o que permanece uma incógnita até o presente momento.

Quando fisiológico a produção ovariana de ERO é um evento de sinalização indispensável à ovulação (Shkolnik et al., 2011), e ocorre mediante controle hormonal (Kodaman & Berhman, 2001). Entretanto a manutenção da integridade dos processos que caracterizam a função reprodutiva é dependente da adequada resolução do evento inflamatório agudo característico da ovulação e da ação de antioxidantes, para a retomada do próximo ciclo reprodutivo. Em nosso modelo experimental, a obesidade ocasionou o aumento, verificado na manhã do estro, da atividade da enzima antioxidante SOD nas fêmeas do grupo CAF, correspondendo aproximadamente ao dobro da atividade enzimática do grupo controle. Essa enzima é responsável pela reação de dismutação do radical superóxido produzido durante processos fisiológicos no ovário. Sugerimos que no grupo CAF estaria ocorrendo maior formação de $O_2^{\cdot-}$, devido a maior atividade da SOD. É sabido que a obesidade envolve uma

produção anormal de citocinas inflamatórias, e como as ERO podem ser formadas durante a resposta inflamatória, a produção excessiva dessas espécies tem sido sugerida como mediadoras das alterações da função reprodutiva associadas à obesidade, em decorrência de estresse oxidativo. No ovário o SRA participa dos eventos que desencadeiam a ovulação, induzindo uma resposta inflamatória característica da ovulação, desta forma, nosso trabalho sugere que a Ang II poderia estar envolvida na produção local de ERO. Logo, considerando os efeitos pró-inflamatórios e pró-oxidantes da Ang II via receptor AT1, nossa hipótese para uma modulação do estado redox ovariano pelo SRA foi testada por meio do tratamento crônico com o losartan. Constatamos uma redução da atividade da enzima SOD quando efetuada a administração do fármaco nos grupos CTLLOS e CAFLOS, o que pode ser indicativo de uma participação da Ang II na produção de ERO, pois os controles também foram afetados por meio da intervenção farmacológica. Outros estudos demonstram uma diminuição da formação de ERO ao realizar o bloqueio do receptor AT1 (Kurata et al., 2006; Tomono et al., 2008). Zimmerman e colaboradores (2002) identificaram o radical superóxido como mediador das ações agudas da Ang II no SNC. No presente trabalho sugerimos que no ovário a Ang II pode estar contribuindo de maneira importante para a geração de $O_2^{\cdot-}$. Em relação às fêmeas do grupo cafeteria, a administração do losartan poderia minimizar uma produção de ERO superior ao fisiológico, devido ao desenvolvimento da obesidade, evitando a ocorrência de depleção das defesas antioxidantes no decorrer de estímulos sucessivos. Foi demonstrado que prejuízos ao mecanismo de remoção de ERO estão associados à infertilidade em fêmeas (Tamura et al., 2013). Um produto da reação de dismutação do radical $O_2^{\cdot-}$ por ação da enzima SOD é o H_2O_2 (Fridovich, 1997), logo o aumento da atividade da enzima SOD no grupo CAF estaria associado ao aumento da produção de H_2O_2 . A remoção desta espécie nos sistemas biológicos ocorre mediante ação das defesas antioxidantes enzimáticas CAT e GPx, expressas no ovário e moduladas por influência hormonal, a fim de manter em níveis fisiológicos a formação e remoção das ERO, as quais são necessárias ao ciclo reprodutivo de fêmeas de mamíferos. Ao avaliarmos a atividade da enzima CAT, na manhã do estro, no grupo CAF a obesidade promoveu um discreto aumento em comparação a atividade da enzima nos controles. A CAT decompõem o H_2O_2 em oxigênio molecular e água, fornecendo proteção às células contra os potenciais efeitos tóxicos do peróxido, essa enzima antioxidante apresenta um KM (constante de Michaelis – Menten) relativamente alto, tornando difícil a sua saturação, portanto elevadas concentrações de H_2O_2 se fazem necessárias para a sua velocidade máxima de reação ser atingida. Ao contrário do observado para a enzima SOD, o tratamento com losartan não alterou significativamente a atividade da

CAT no grupo controle, mas no grupo CAFLOS o losartan impediu o aumento adicional da CAT, desta forma as fêmeas que receberam a dieta associada ao bloqueio do receptor AT1 mantiveram a atividade da CAT similar ao CTL.

No processo de sinalização celular a formação de H_2O_2 é indispensável para a ovulação, e desencadeia a ruptura do folículo e liberação do oócito, por atuar mediando a transdução de sinal do hormônio LH nos folículos. Em decorrência do excesso de adiposidade, as fêmeas do grupo CAF apresentaram uma produção elevada de H_2O_2 em relação ao grupo controle, o que pode ter sido consequência de uma remoção insuficiente por parte da CAT ou por outros sistemas de defesa como a GPx. A administração crônica de losartan não influenciou significativamente a concentração de H_2O_2 nos grupos CTLOS e CAFLOS. Este resultado indica que, no ovário, existem outras fontes de ERO que podem ser responsáveis pela geração de H_2O_2 , as quais estariam contribuindo mais efetivamente para a concentração de H_2O_2 nesse tecido, dessa forma, é possível que o SRA ovariano participe da formação de ERO durante a ovulação, por meio da geração de superóxido. As fontes adicionais de H_2O_2 podem ser intracelulares, em decorrência da estimulação de receptores, ou extracelulares, provenientes de células inflamatórias (Schkonilk et al., 2011).

Durante a foliculogênese, evento que antecede a ovulação, os níveis de H_2O_2 variam com o crescimento dos folículos, e sugere-se uma relação inversa entre o conteúdo de H_2O_2 e o tamanho dos folículos em crescimento, assim conforme a progressão do ciclo estral os níveis de peróxido decrescem (Gupta et al., 2011). A formação do folículo pré-ovulatório é necessário para a ovulação, e depende do desenvolvimento folicular adequado, portanto sugerimos que em concentrações superiores as fisiológicas o H_2O_2 poderia inibir o crescimento e o desenvolvimento folicular, e conseqüentemente ocasionar prejuízos à ovulação, o que explicaria em parte a diminuição da ovulação nas ratas CAF. Em um estudo anterior, realizados por nosso grupo de pesquisa (dados não publicados) foi verificado uma redução no número de folículos pré-antrais e na espessura da camada da teca em folículos antrais de fêmeas com obesidade induzida por dieta (Menezes, 2010). Posteriormente, utilizando o mesmo modelo experimental, constatou-se que a obesidade inibe o aumento pré-ovulatório de progesterona na tarde do proestro, indicando que o resultado observado anteriormente poderia estar relacionado com a redução da capacidade esteroidogênica; ainda neste estudo, também foi observado ausência do aumento pré-ovulatório de LH (Sagae et al., 2012). No tecido ovariano, demonstrou-se que peróxidos, em concentração dose dependente, podem inibir os receptores de LH e de FSH, e podem ocasionar a diminuição da produção de progesterona (Margolin et al., 1990).

Na sequência de eventos após a ovulação, o H_2O_2 participa modulando a produção hormonal na fase lútea (Vega et al., 1995), e estudos “in vitro” demonstram que o efeito é dose dependente, desta forma, dependendo dos níveis de H_2O_2 no ovário a sua ação pode ser anti-esteroidogênica (Endo et al., 1993; Taketani et al., 2011). A relevância de avaliarmos a geração de H_2O_2 nas fêmeas obesas, e o efeito da Ang II por meio da administração de Losartan, é devido à importância dessa espécie durante a sinalização de uma variedade de eventos da função reprodutiva. Goud e colaboradores (2008) observaram que a administração exógena de ERO, incluindo H_2O_2 , prejudica a viabilidade de oócitos de camundongos. O papel das ERO e do estresse oxidativo na fisiologia reprodutiva de fêmeas de mamíferos é assunto de estudo, devido às observações do envolvimento dessas moléculas em patologias reprodutivas e na infertilidade (Argawal et al., 2003).

Em condições que ultrapassem os mecanismos de remoção, no caso a defesa antioxidante, o acúmulo de ERO pode resultar em estresse oxidativo, situação na qual as ERO estão envolvidas em danos celulares, incluindo peroxidação lipídica, oxidação de aminoácidos e ácidos nucleicos, causando dano ao DNA, e processos de apoptose ou necrose (Halliwell, 1992). Por meio da técnica de Quimiluminescência, avaliamos a peroxidação lipídica. A medida não revelou alterações com significância estatística em razão da ocorrência de obesidade nas fêmeas da dieta de cafeteria, esse grupo apresentou um dano a lipídeos de membrana que pode ser compreendido como consequência de um evento que levou à ovulação, pois foi semelhante ao encontrado no grupo controle. No caso da ovulação, a peroxidação lipídica é considerada um evento fisiológico e estaria envolvida com o processo de ruptura folicular, pois alteração na permeabilidade de membrana pode facilitar esse processo de expulsão do oócito (Fujji et al., 2005). Como a obesidade está relacionada ao aumento da produção de ERO, consideramos a possibilidade de ocorrer uma maior oxidação de lipídeos no ovário, o que não foi constatado, portanto, supomos que prejuízos à capacidade reprodutiva ocorram anteriormente ao desenvolvimento de danos ao tecido ovariano. Com a administração do antagonista do receptor AT1 da Ang II, Losartan, a peroxidação lipídica, enquanto fisiológica, não foi alterada nos grupos CTLLOS e CAFLOS. Além de ocasionar danos a lipídeos de membrana, as ERO podem mediar danos às proteínas celulares (Valko et al., 2006). Quando em concentrações elevadas a espécie H_2O_2 pode ocasionar oxidação de proteínas. Portanto, avaliamos a formação de carbonilas. Os aminoácidos, constituintes das proteínas, quando oxidados formam uma variedade de produtos, dos quais as carbonilas são mais facilmente quantificadas e, desta forma, servem na avaliação da oxidação de proteínas dentro das células (Imlay, 2008). A obesidade induzida por dieta não alterou

significativamente a formação de carbonilas, sugerindo que neste modelo experimental os efeitos da obesidade não envolvem dano a proteínas. Conforme nossos resultados mediante o bloqueio do receptor AT1, a Ang II parece não influenciar a oxidação de lipídeos e proteínas. Logo, seu efeito sobre o estado redox ovariano envolveria a modulação da enzima SOD, como resultado da indução do radical $O_2^{\cdot -}$ provavelmente pela ativação da NADPH oxidase durante a transdução de sinal.

As ERO podem atuar como moléculas de sinalização celular quando em baixas/moderadas concentrações, para tal os mecanismos de defesa antioxidante encontram-se organizados em sistemas redox sensíveis. Em situação de estresse oxidativo pode ser desencadeado uma interrupção dos processos regulados por um sistema redox, mesmo em ausência de dano mediado por ERO (Jones, 2008). Portanto, mesmo em ausência de dano, o aumento da formação de H_2O_2 observado nas fêmeas obesas pode estar associado a prejuízos na fertilidade nesses animais, devido ao potencial em alterar o processo de sinalização no tecido ovariano, no entanto um estudo mais detalhado seria necessário para maiores esclarecimentos. Em folículos ovarianos os estímulos que iniciam a morte celular por apoptose envolvem primeiramente um aumento na formação ERO, além disso, o envelhecimento do ovário foi associado com a diminuição da expressão de genes antioxidantes, resultando em danos oxidativos (Lim & Luderer, 2011).

8.CONCLUSÕES

A exposição à dieta de cafeteria, a partir do desmame até a idade adulta, ocasiona modificações na ingestão alimentar, resultando em aumento da adiposidade, ganho de peso e hiperinsulinemia de jejum. A administração do antagonista do receptor AT1 da Ang II, losartan minimiza a hiperinsulinemia de jejum e o acúmulo de gordura abdominal (visceral) nas fêmeas da dieta de cafeteria, isto sugere uma participação da Ang II nos efeitos deletérios da obesidade. A obesidade, no presente modelo experimental, não ocasiona redução do número de oócitos liberados na manhã do estro, mas modifica o metabolismo oxidativo ovariano, ocasiona aumento da atividade da enzima SOD e CAT, e aumenta a formação de H_2O_2 no ovário. A associação do bloqueio do receptor AT1 previne o aumento da SOD em fêmeas obesas, o que sugere o envolvimento da Ang II como mediadora da geração do radical superóxido. Os dados apresentados neste estudo indicam uma participação da Ang II na formação fisiológica de ERO no ovário, mas como uma fonte adicional de ERO e não como fonte primária, devido à ausência de efeito sobre a formação de peróxido de hidrogênio, que se manteve em concentração superior aos animais controles. Apesar de não ocorrer alteração na oxidação de lipídeos no ovário e nem danos a proteínas, o aumento dos níveis basais de H_2O_2 no ovário pode estar associado ao estado de estresse oxidativo, e constituir um dos mecanismos (de origem intra-ovariano) pelo qual a obesidade está associada com alterações reprodutivas. Considerando a importância das ERO na função reprodutiva de fêmeas e o fato da obesidade alterar o estado redox ovariano, conhecer os fatores que modulam a formação de ERO, poderá contribuir para novas investigações a respeito dos mecanismos pelos quais o excesso de peso pode causar prejuízos à reprodução.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta TJ, Berisha B, Ozawa T, Sato K, Schams D, Miyamoto A. Evidence for a local endothelin-angiotensin-atrial natriuretic peptide system in bovine mature follicles in vitro: effects on steroid hormones and prostaglandin secretion. *Biology of Reproduction*. 1999; 61(6):1419-1425.

Acosta TJ, Yoshizawa N, Ohtani M, Miyamoto A. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F₂ α injection in the cow. *Biology of Reproduction*. 2002; (66):651–658.

Acosta TJ, Miyamoto A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Animal Reproductive Science*. 2004; (83):127-140.

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984; 105:121-126.

Agarwal A, Salen RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*. 2003;79:829-843.

Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2005a; 3(28): 1-21.

Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Oxidative stress and its implications in female infertility - a clinician's perspective. *Reprod Biomed*. 2005b; 11(5): 641-650.

Agarwal A, Gupta S, Sekhon L, Shah R. Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*. 2008; 10: 1376-1388.

Akamine EH, Marçal AC, Camporez JP, Hoshida MS, Caperuto LC, Bevilacqua E, Carvalho CR. Obesity induced by high-fat diet promotes insulin resistance in the ovary. *J Endocrinol*. 2010; 206(1):65-74.

Alsö J, Olszewski PK, Norbäck AH, Gunnarsson ZE, Levine AS, Pickering C, Schiöth HB. Dopamine D1 receptor gene expression decreases in the nucleus accumbens upon long-term exposure to palatable food and differs depending on diet-induced obesity phenotype in rats. *Neuroscience*. 2010; 171(3):779-87.

Appasamy M, Jauniaux E, Serhal P, Al-Qahtani A, Groome NP, Muttukrishna S. Evaluation of the relationship between follicular fluid oxidative stress, ovarian hormones, and response to gonadotropin stimulation. *Fertility and Sterility*. 2008; 89(4):912-921.

Araki K, Masaki T, Katsuragi I, Tanaka K, Kakuma T, Yoshimatsu H. Telmisartan prevents obesity and increases the expression of uncoupling protein 1 in diet induced obese mice. *Hypertension*. 2006; 48:51-57.

Aubert G, Burnier M, Dulloo A, Perregaux C, Mazzolai L, Pralong F, Zanchi A. Neuroendocrine characterization and anorexigenic effects of telmisartan in diet and glitazone-induced weight gain. *Metabolism*. 2010; 59(1):25-32.

Barreta MH, Oliveira JFC, Ferreira R, Antoniazzi AQ, Gasperin BG, Sandri LR, Gonçalves PBD. Evidence that the effect of angiotensin II on bovine oocyte nuclear maturation is mediated by prostaglandins E2 and F2 α . *Reproduction*. 2008; 136:733–740.

Batenburg WW, Garrelds IM, Bernasconi CC, Juillerat-Jeanneret L, van Kats JP, Saxena PR, Danser AH. Angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation in human coronary microarteries. *Circulation*. 2004; 109: 2296-2301.

Beckman KD, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*. 1998; 78(2):547-581.

Biro FM, Wien M. Childhood obesity and adult morbidities. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2010; 91(5):1449-1505.

Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978; 52:302-10.

Boustany CM, Bharadwaj K, Daugherty A, Brown DR, Randall DC, Cassis LA. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;287(4):R943-949.

Brink M, Wellen J, and Delafontaine P. Angiotensin II causes weight loss and decreases circulating insulin-like growth factor I in rats through a pressor-independent mechanism. *J Clin Invest*. 1996; 97(11):2509-2516.

Brothers KJ, Wu S, DiVall SA, Messmer MR, Kahn CR, Miller RS, Radovick S, Wondisford FE, Wolfe A. Rescue of obesity-induced infertility in female mice due to a pituitary-specific knockout of the insulin receptor (IR). *Cell Metab*. 2010 September 8; 12(3): 295–305.

Bumpus FM, Catt KJ, Chiu AT, De Gasparo M, Goodfriend T, Husain A, Peach MJ, Taylor DG Jr., Timmermans PB. Nomenclature for angiotensin receptors. A report of the Nomenclature Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertension*. 1991; 17(5):720-721.

Carroll WX, Kalupahana NS, Booker SL, Siriwardhana N, Lemieux M, Saxton AM, Moustaid-Moussa N. Angiotensinogen gene silencing reduces markers of lipid accumulation and inflammation in cultured adipocytes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013; 4(10):1-12.

Cassis LA, Marshall DE, Fettinger MJ, Rosenbluth B, Lodder RA. Mechanisms contributing to angiotensin II regulation of body weight. *Am J Physiol*. 1998; 274(5):E867-876.

Cassis L, Helton M, English V, Burke G. Local Adipose Tissue Renin-Angiotensin System. *Curr Hypertens Rep*. 2008; 10(2): 93–98.

Castell-Auvía A, Cedóla L, Pallaresa V, Blaya M, Ardévola A, Pinent M. The effects of a cafeteria diet on insulin production and clearance in rats. *British Journal of Nutrition*. 2012; 108(7):1155-62.

Chavarro JE, Rich-Edwards JW, Rosner BA, Willett WC. Diet and lifestyle in the prevention of ovulatory disorder infertility. *Obstet Gynecol*. 2007; 110:1050–1058.

Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, Ardecky RJ, Carini DJ, Duncia JV, Pease LJ, Wong PC, Wexler RR, Johnson AL et al. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 165:196-203.

Colombo G., Bazzo M.L, Nogueira C.L, Colombo M.D.H.P, Schiavon L.L. and d'Acampora A.J. A study on the short-term effect of cafeteria diet and pioglitazone on insulin resistance and serum levels of adiponectin and ghrelin. *Braz J Med Biol Res.* 2012; 45(10) 935-941.

Cooper R, McFarlane-Anderson N, Bennett FI, Wilks R, Puras A, Tewksbury D, Ward R, Forrester T. ACE, angiotensinogen and obesity: a potential pathway leading to hypertension. *Journal of Human Hypertension.* 1997; 11:107–111.

Dandona P, Ghanim H, Chaudhuri A, Dhindsa S, Kim SS. Macronutrient intake induces oxidative and inflammatory stress: potential relevance to atherosclerosis and insulin resistance. *Experimental and Molecular Medicine.* 2010; 42(4):245-253.

Daud AI, Bumpus FM, Husain A. Evidence for selective expression of angiotensin II receptors on atretic follicles in the rat ovary: an autoradiographic study. *Endocrinology.* 1988; 122:2727-2734.

Davisson R.L., Oliverio M.I., Coffman T.M., Sigmund C.D. Divergent functions of angiotensin II receptor isoforms in brain. *J. Clin. Invest.* 2000;106:103–106.

de Gooyer TE, Skinner SL, Wlodek ME, Kelly DJ, Wilkinson-Berka JL. Angiotensin II influences ovarian follicle development in the transgenic (mRen2)²⁷ and Sprague-Dawley rat. *J Endocrinol.* 2004; 180(2):311-324.

Donadio MV, Kunrath A, Corezola KL, Franci CR, Anselmo-Franci JA, Lucion AB, Sanvitto GL. Effects of acute stress on the day of proestrus on sexual behavior and ovulation in female rats: participation of the angiotensinergic system. *Physiol Behav.* 2007; 92(4):591-600.

Droge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev.* 2002; 82:47-95.

Duleba AJ, Foyouzi N, Karaca M, Pehlivan T, Kwintkiewicz J, Behrman H.R. Proliferation of ovarian theca-interstitial cells is modulated by antioxidants and oxidative stress. *Human Reproduction*. 2004; 19(7):1519-1524.

Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. *The New England Journal of Medicine*. 2005; 352:1223–1236.

Endo T, Aten RF, Leykin L, Behrman HR. Hydrogen peroxide evokes antisteroidogenic and antigonadotropic actions in human granulosa luteal cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1993; 76(2):337-342.

Engeli S, Negrel R, Sharma AM. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension*. 2000, 35:1270-1277.

Engeli S, Schling P, Gorzelniak K, Boschmann M, Janke J, Ailhaud G, Teboul M, Massiera F, Sharma AM. The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *Int J Biochem Cell Biol*. 2003; 35:807-825.

Engeli Stefan, Bohnke Jana, Gorzelniak Kerstin, Janke Jurgen, Schling Petra, Bader Michael, Luft Friedrich C., Sharma Arya M. Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Hypertension*. 2005; 45:356-362.

Espey LL. Ovulation as an inflammatory reaction--a hypothesis. *Biol Reprod*. 1980; 22(1):73-106.

Espey LL. A review of factors that could influence membrane potentials of ovarian follicular cells during mammalian ovulation. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1992; 126 Suppl 2 1-31.

Esposito LA, Melov S, Panov A, Cottrell BA, Wallace DC. Mitochondrial disease in mouse resulting increased oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(9):4820-4825.

Esposito K, Giugliano D. Diet and inflammation: a link to metabolic and cardiovascular diseases. *Eur Heart J*. 2006 Jan; 27(1):15-20.

Evans JJ, Anderson GM. Balancing ovulation and anovulation: integration of the reproductive and energy balance axes by neuropeptides. *Human Reproduction Update*. 2012; 18(3):313–332.

Ferreira R, Oliveira JF, Fernandes R, Moraes JF, Gonçalves PB. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. *Reproduction*. 2007; 134:713–719.

Ferreira R, Gasperin B, Rovani M, Santos J, Barreta M, Bohrer R, Price C, Gonçalves BPD. Angiotensin II Signaling Promotes Follicle Growth and Dominance in Cattle. *Endocrinology*. 2011; 152: 4957– 4965.

Fitzsimons JT. Angiotensin in the control of water and sodium intake. *Soc Gen Physiol*. 1980; 35:99-106.

Freeman ME. The ovarian cycle of the rat. In: E. Knobil & J. Neids (eds.), *Physiology of reproduction*. Raven Press Ltd., New York, 1988, pp 1893-1928.

Fridovich, Irwin. Superoxide Anion Radical ($O_2^{\cdot-}$), Superoxide Dismutases, and Related Matters. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272(30):18515–18517.

Fujii J, Iuchi Y, Okada F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod Biol and Endocr*. 2005; 3(43):1-10.

Galica S, Oakhilla JS, Steinberga GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2010; 316:129–139.

Gamba M, Pralong FP. Control of GnRH neuronal activity by metabolic factors: The role of leptin and insulin. *Mol and Cell Endocrinology*. 2006; 254-255: 133-139.

Garcia-Contreras F, Paniagua R, Avila-Diaz M, Cabrera-Muñoz L, Martínez-Muñiz I, Foyo-Niembro E, Amato D. Cola beverage consumption induces bone mineralization reduction in ovariectomized rats. *Arch Med Res*. 2000; 31(4):360–365.

Giacchetti G, Faloia E, Mariniello B, Sardu C, Gatti C, Camilloni MA, Guerrieri M, Mantero F. Overexpression of the Renin-Angiotensin System in Human Visceral Adipose Tissue in Normal and Overweight Subjects. *Am J Hypertens*. 2002;15(5): 381-388

Goldim JR, Raymundo MM. Pesquisa em saúde e direito dos animais. HCPA, Porto Alegre, RS, 1997; 2ª edição.

Gomes CM, Frantz PJ, Sanvitto GL, Anselmo-Franci JÁ, Lucion AB. Neonatal handling induces anovulatory estrous cycles in rats. *Braz J Medical Biol Res*. 1999;32:1239-1242.

Gonçalves PB, Ferreira R, Gasperin B, Oliveira JF. Role of angiotensin in ovarian follicular development and ovulation in mammals: a review of recent advances. *Reproduction*. 2012; 143(1):11-20.

Gonzales-Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of liver, heart and muscle. *Free Radic Biol Med*. 1991; 10(2):93-100.

Goud AP, Goud PT, Diamond MP, Gonik B, Abu-Soud HM. Reactive oxygen species and oocyte aging: role of superoxide, hydrogen peroxide and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med*. 2008; 44(7): 1295–1304.

Goulart JF, Ferreira MB, Sanvitto GL. Effects of food pattern change and physical exercise on cafeteria diet-induced obesity in female rats. *British Journal of Nutrition*. 2012;108(8):1511-8.

Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1994 Jun;74(6):1141-1148.

Griendling KK; Ushio-Fukai M. Reactive oxygen species as mediator of angiotensin II signaling. *Regulatory peptides*. 2000; 91(1-3):21-27.

Grobe JC, Rahmouni K, Liu X, Sigmund CD. Metabolic rate regulation by rennin angiotensin system: brain vs. body. *Pflugers Arch – Eur J Physiol*. 2013; 465(1):167-175.

Gupta S, Choi A, Yu HY, Czerniak SM, Holick EA, Paoella LJ, Agarwal A, Combelles CM. Fluctuations in total antioxidant capacity, catalase activity, and hydrogen peroxide levels of follicular fluid during bovine folliculogenesis. *Reprod Fertil Dev.* 2011; 23(5): 673–680.

Hajnal A and Norgren R. Accumbens dopamine mechanisms in sucrose intake. *Brain Research.* 2001; 904: 76–84.

Hajnal A, Smith GP and Norgren R. Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004; 286: R31–R37.

Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med.* 1992; 119:598-620.

Halliwell B and Gutteridge W. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews.* 1999; 52: 253-265.

Halliwell IB and Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* 3ed. London: Oxford University Press, 2000.

Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006;141(2):312-322.

Halliwell B. The wanderings of free radical. *Free radical Bio Med.* 2009; 46:531-542.

Halliwell IB and Gutteridge JMC. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2010; 393: 561–564.

Hill JO and Peters JC. Environmental Contributions to the obesity epidemic. *Science.* 1998; 280:1371-1373.

Husain A, Bumpus FM, de Silva P, Speth RC. Localization of angiotensin II receptors in ovarian follicles and the identification of angiotensin II in rat ovaries. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987; 84:2489-2493.

Imlay, James A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem.*2008; 77: 755–776.

Johren O, Imboden H, Hauser W, Mayer I, Sanvitto GL, Saavareda JM. Localization of angiotensin-converting enzyme, angiotensin II, angiotensin II receptor subtypes and vasopressin in the mouse hypothalamus. *Brain Res.*1997; 757:218-227.

Johson PM, Kenny PJ. Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nature Neuroscience.*2010; 13(5):635-641.

Jones, Dean P. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008; 295: C849–C868.

Jungheim ES, Schoeller EL, Marquard KL, Louden ED, Schaffer JE, Moley KH. Diet-Induced Obesity Model: Abnormal Oocytes and Persistent Growth Abnormalities in the Offspring. *Endocrinology.*2010; 151(9):4039-4046.

Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N. The renin-angiotensin system: a link between obesity, inflammation and insulin resistance. *Obesity Reviews.* 2012; 13(2):136-49.

Kodman BM, Behrman HR. Endocrine-regulated and protein kinase C-dependent generation of superoxide by rat preovulatory follicles. *Endocrinology.* 2001; 142(2):687-693.

Kouyama R, Juganami T, Nishida J, Tanaka M, Toyola T, Kiso M, Chiwata T, Miyamoto Y, Yoshimasa Y, Fukamizu A, Horiuchi M, Hirata Y, Ogawa Y. Attenuation of diet-induced weight gain and adiposity through increased energy expenditure in mice lacking angiotensin II type 1a receptor. *Endocrinol.* 2005; 146(8):3481-3489.

Kovacs P and Hajnal A. Altered Pontine Taste Processing in a Rat Model of Obesity. *Journal of Neurophysiology.* 2008; 100: 2145–2157.

Kurata A, Nishizawa H, Kihara S, Maeda N, Sonoda M, Okada T, Ohashi K, Hibuse T, Fujita K, Yasui A, Hiuge A, Kumada M, Kuriyama H, Shimomura I, Funahashi T. Blockade of

Angiotensin II type-1 receptor reduces oxidative stress in adipose tissue and ameliorates adipocytokine dysregulation. *Kidney International*. 2006; 70(10):1717-1724.

Kuşçu NK, Var A. Oxidative stress but not endothelial dysfunction exists in non-obese, young group of patients with polycystic ovary syndrome. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2009; 88(5): 612-617.

La Fleur SE, Vanderschuren LJ, Luijendijk MC, Kloeze BM, Tiesjema B, Adan RA. A reciprocal interaction between food-motivated behavior and diet-induced obesity. *International Journal of Obesity (Lond)*. 2007; 31(8): 1286–1294.

Lassègue Bernard and Clempus Roza E. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003; 285:R277-R297.

Leibowitz SF, Wortley KE. Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides*. 2004; 25(3):473-504.

Lenkei DA, Palkovits M, Corvol P, Llorens-Cortés C. Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. *Front Neuroendocrinol*. 1997; 18:383-439.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1990; 186: 464-478.

Li X, Yuan L, Li J, Li H, Cheng S. Blockade of Renin Angiotensin System Increased Resistance to STZ-Induced Diabetes in Rats with Long-Term High-Fat Diet. *Experimental Diabetes Research*. 2012; 2012:618923.

Light HR, Tsanzi E, Gigliotti J, Morgan k, Tou JC. The type of caloric sweetener added to water influences weight gain, fat mass, and reproduction in growing sprague-dawley female rats. *Experimental Biology and Medicine*. 2009; 234:651-661.

Lightman A, Tarlatzis BC, Rzasz PJ, Culler MD, Caride VJ, Negro-Vilar AF, Lennard D, DeCherney AH, Naftolin F. The ovarian renin-angiotensin system: renin-like activity and angiotensin II/III immunoreactivity in gonadotropin-stimulated and unstimulated human follicular fluid. *Am J Obstet Gynecol.*1987; 156:808-816.

Lim, Jinhwan and Luderer, Ulrike. Oxidative Damage Increases and Antioxidant Gene Expression Decreases with Aging in the Mouse Ovary. *Biology of Reproduction.*2011; 84:775–782.

Liu L, Trimarchi JR, Keefe DL. Involvement of Mitochondria in Oxidative Stress-Induced Cell Death in Mouse Zygotes. *Biology of Reproduction.* 2000; 62(6):1745-1753.

Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adrimycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori.*1985; 71(3):241-249.

Lordelo RA, et al. Eixos Hormonais na Obesidade: Causa ou Efeito. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2007; 51(1):34-41.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265–267.

Luzzo KM, Wang Q, Purcell SH, Chi M, Jimenez PT, Grindler N, Schedl T, Moley KH. High Fat Diet Induced Developmental Defects in the Mouse: Oocyte Meiotic Aneuploidy and Fetal Growth Retardation/Brain Defects. *PLoS One* 2012; 7(11): e49217.

Maklund SL. Oxygen toxicity and protective systems. *J Toxicol Clin Toxicol.*1985; 23:289-298.

Margolin Y, Aten RF, Behrman HR. Antigonadotropic and antisteroidogenic actions of peroxide in rat granulosa cells. *Endocrinology.*1990; 245-250.

Martire SI, Holmes N, Westbrook RF, Morris MJ. Altered Feeding Patterns in Rats Exposed to a Palatable Cafeteria Diet: Increased Snacking and Its Implications for Development of Obesity. *PLoS One*.2013; 8(4): e60407.

McKinley MJ, Denton DA, Oldfield BJ, De Oliveira LB, Mathai ML. Water intake and the neural correlates of the consciousness of thirst. *Semin Nephrol*. 2006; 26(3):249-57.

McKinley MJ, Johnson AK. The physiological regulation of thirst and fluid intake. *News Physiol Sci*. 2004; 19:1-6.

Massiera F, Seydoux J, Geloën A, Quignard-Boulangé A, Turban S, Saint-Marc P, Fukamizu A, Raymond N, Ailhaud G, Michéle T. Angiotensinogen-deficient mice exhibit impairment of diet-induced weight gain with alteration in adipose tissue development and increased locomotor activity. *Endocrinology*. 2001; 142(12): 5220–5225.

Menezes EF. Efeito da indução de obesidade pela dieta de cafeteria a partir dos 21 dias de idade sobre a estrutura e o desenvolvimento folicular de ratas Wistar. Porto Alegre, UFRGS, 2010. (Dissertação), Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 55p.

Milei J, Otero-Losada M, Gómez HL, Grana DR, Suárez D, Azzato F, Ambrosio G. Chronic cola drinking induces metabolic and cardiac alterations in rats. *World J Cardiol*.2011; 3(4): 111–116.

Mikuni M, Branstrom M, Hellberg P, Peterson AC, Pall M, Edwin SS, Peterson CM. Saralasin-induced inhibition of ovulation in the in vitro perfused rat ovary is not replicated by the angiotensin II type-2 receptor antagonist PD123319. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*.1998; 179(1):35-40.

Mitsube K, Mikuni M, Matousek M, Zackrisson U, Brannstrom M. Role of the angiotensin II system in regulation of ovulation and blood flow in the rat ovary. *Reproduction*.2003; 125:425–435.

Miyazaki T, Sueoka K, Dharmarajan AM, Atlas SJ, Bulkley GB, Wallach EE. Effect of inhibition of oxygen free radical on ovulation and progesterone production by the in-vitro perfused rabbit ovary. *J Reprod Fert.*1991; 91:207-212.

Mussad S, Haynes EN. Biomarkers of obesity and subsequent cardiovascular events. *Epimediologic Reviews.* 2007; 29(1):98-114.

Naim M, Brand JG, Kare MR, Carpenter RG. Energy intake, weight gain and fat deposition in rats fed flavored, nutritionally controlled diets in a multichoice ("cafeteria") design. *Journal of Nutrition.*1985; 115(11):1447-1458.

Nelson SM, Fleming RF. The preconceptional contraception paradigm: obesity and infertility. *Human Reproduction.* 2007;22(4):912-915.

Nguyen Dinh Cat A, Montezano AC, Burger D, Touyz RM. Angiotensin II, NADPH Oxidase, and Redox Signaling in the Vasculature. *Antioxid Redox Signal.* 2013; 19(10):1110-20.

Norgren R, Hajnal A, Mungarndee SS. Gustatory reward and the nucleus accumbens. *Physiol Behav.* 2006; 89(4):531-5.

Obermüller N, Schlamp D, Hoffmann S, Gentili M, Inagami T, Gretz N, Weigel M. Localization of the mRNA for the angiotensin II receptor subtype 2 (AT2) in follicular granulosa cells of the rat ovary by non-radioactive in situ hybridization. *J Histochem Cytochem.* 1998; 46:865–870.

Obermuller N, Gentili M, Gauer S, Gretz N, Weigel M, Geiger H, Gassler N. Immunohistochemical and mRNA Localization of the Angiotensin II Receptor Subtype 2 (AT2) in Follicular Granulosa Cells of the Rat Ovary. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.*2004; 52(4):545-548.

Ogur P, Uysal B, Ogur T, Yaman H, Oztas E, Ozdemir A, Hasde M. Evaluation of the Effect of Cola Drinks on Bone Mineral Density and Associated Factors. *Basico Clin Pharmacol Toxicol.* 2007; 100(5):334-338.

Ohinata K, Fujiwara Y, Fukumoto S, Iwai M, Horiuchi M, Yoshikawa M. Angiotensin II and III suppress food intake via angiotensin AT2 receptor and prostaglandin EP4 receptor in mice. *FEBS Letters*.2008; 582:773–777.

Otero-Losada ME, Grana DR, Müller A, Ottaviano G, Ambrosio G, Milei J. Lipid profile and plasma antioxidant status in sweet carbonated beverage-induced metabolic syndrome in rat. *Int J Cardiol*. 2011; 146: 106-109.

Pacher PL, Beckman JS, Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev*.2007; 87:315-423.

Pan HL. Brain angiotensin II and synaptic transmission. *The Neuroscientist*. 2004; 10:422-431.

Pandit R, Mercer JG, Overduin J, la Fleur SE, Adan RAH. Dietary factors affect food reward and motivation to eat. *Obesity Facts*.2012; 5:221–242.

Pasquali R, Pelusi C, Genghini S, Cacciari M, Gambineri A. Obesity and reproductive disorders in women. *Hum Reprod Update*. 2003; 9(4): 359-372.

Pasquali R, Vicennati V, Cacciari M, Pagotto U. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in obesity and the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1083:111-128.

Pasquali R, Vicennati V, Cacciari M, Pagotto U. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in obesity and the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1083:111-128.

Pasquali R, Patton L, Gambineri A. Obesity and infertility. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity*.2007; 14:482–487.

Patel C, Ghanim H, Ravishankar S, Sia CL, Viswanathan P, Mohanty P, Dandona P. Reactive oxygen species generation and nuclear factor- β activation after a high-fat, high-carbohydrate meal in the obese. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92(11):4476-4479.

Pellicer A, Palumbo A, DeCherney A, Naftolin, F. Blockage of ovulation by an angiotensin antagonist. *Science*. 1988; 240: 1660–1661

Peng H, Li W, Seth DM, Nair AR, Francis J, Feng Y. (Pro)renin receptor mediates both angiotensin II dependent and -independent oxidative stress in neuronal cells. *PLoS ONE*. 2013;8(3): e58339. doi:10.1371/journal.pone.0058339.

Pereira MA. The possible role of sugar-sweetened beverages in obesity etiology: a review of the evidence. *Int J Obes* 2006; 30 Suppl:28S–36S.

Peterson CM, Morioka N, Zhu C, Ryan JW, LeMaire WJ. Angiotensin-converting enzyme inhibitors have no effect on ovulation and ovarian steroidogenesis in the perfused rat ovary. *Reprod Toxicol*. 1993; 7(2):131-135.

Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods*. 1980; 38(1-2):161-170.

Polidori C, Ciccocioppo R, Pompei P, Cirillo R, Massi M. Functional evidence for the ability of angiotensin AT1 receptor antagonists to cross the blood-brain barrier in rats. *European Journal of Pharmacology*. 1996; 307(3):259-267.

Polidori C, Ciccocioppo R, Nisato D, Cazaubon C, Massi M. Evaluation of the ability of irbesartan to cross the blood-brain barrier following acute intragastric treatment. *European Journal of Pharmacology*. 1998; 352(1):15-21.

Porter JP, Potratz KR. Effect of intracerebroventricular angiotensin II on body weight and food intake in adult rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004; 287: R422–R428.

Pou KM, Massaro JM, Hoffmann U, Vasan RS, Maurovichhorvat P, Larson, MG, et al. Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue Volumes Are Cross-Sectionally Related to Markers of Inflammation and Oxidative Stress. *Circulation*. 2007; 116:1234-1241.

Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, Corezola do Amaral ME, Höer NF, Boschero AC, Saad MJ. Western diet modulates insulin signaling activity and IRS-1 ser 307 phosphonilation in tissue-specific fashion. *Endocrinology*.2005; 146(3):1576-1587.

Prasad A, Quyyumi AA. Renin-angiotensin system and angiotensin receptor blockers in the metabolic syndrome. *Circulation*.2004; 110:1507-1512.

Reznick AZ, Packer L. Carbonyl assays for determination of oxidatively modifical proteins. *Methods in Enzymology*.1994; 233:357-363.

Rial E, Rodríguez-Sánchez L, Gallardo-Vara E, Zaragoza P, Moyano E, González-Barroso MM. Lipotoxicity, fat acid uncoupling and mitochondrial carrier function. *Biochimica & Acta - Bioenergetics*. 2010; 1797(6-7):800-806.

Riley JCM, Behrman HR. Oxygen Radicals and Reactive Oxygen Species in Reproduction. *Proc Soc Exp Biol Med*.1991; 198:781-791.

Rodríguez E, Ribot J, Rodríguez AM, Palou A. PPAR- γ 2 expression in response to cafeteria diet: gender- and depot-specific effects. *Obesity Research*. 2004; 12(9):1455-1463.

Rouch M, Schimid HA. Functional evidence for subfornicl organ-intrinsic conversion of angiotensin I to angiotensin II. *AM J Physiol*.1999; 276(6):R1630-8.

Ruder EH, Hartman TJ, Goldman MB. Impact of oxidative stress on female fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2009; 21(3): 219-222.

Saavedra JM. Brain and pituitary angiotensin. *Endocr Rev*. 1992; 13: 329-380.

Saavedra JM, Ando H, Armando I, Baiardi G, Bregonzio C, Jezova M, Zhou J. Brain angiotensin II, an important stress hormone: regulatory sites and therapeutic opportunities. *Ann N Y Acad Sci*. 2004; 1018:76-84.

Safonova I, Aubert J, Negrel R, Ailhaud G. Regulation by fatty acids of angiotensinogen gene expression in preadipose cells. *Biochem J.*1997; 322: 235-239.

Sagae SC, Menezes EF, Bonfleur ML, Vanzela EC, Zacharias P, Lubaczeuski C, et al. Early onset of obesity induces reproductive deficits in female rats. *Physiol Behav.*2012; 105(5):1104-1111.

Sagae SC, Lubaczeuski C, Zacharias P, Bonfleur ML, Franci CR, Sanvitto GL. Prevention of metabolic disorders and reproductive performance deficits by the blockade of Angiotensin II AT1 receptor in female rats fed with cafeteria diet. *Physiol Behav.* 2013; 119:1-8.

Salvi R, Castillo E, Voirol MJ, Glauser M, Rey JP, Gaillard RC, Vollenweider P, Pralong FP. Gonadotropin-releasing hormone-expressing neurons immortalized conditionally are activated by insulin: implication of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology.*2006 Feb; 147(2):816-826.

Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, Newgard CB, Makowski L. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring).*2011; 19(6):1109–1117.

Savini I, Catani MV, Evangelista D, Gasperi V, Avigliano L. Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 10497-10538.

Sawada M, Carlson JC. Intracellular regulation of progesterone secretion by the superoxide radical in the rat corpus luteum. *Endocrinology.*1996 May; 137(5):1580-1584.

Schneider JE. Energy balance and reproduction. *Physiology & Behavior.*2004; 81(2):289-317.

Schkonilk K, Tadmor A, Ben-Dor S, Nevo N, Galiani, Dekel N. Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *PNAS.* 2011; 108(4):1462-1467.

Schwartz GJ. The role of gastrointestinal vagal afferent in control of food intake, current prospects. *Nutrition.*2000; 16:866-873.

Shafat A, Murray B, Rumsey D. Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat. *Appetite*.2009; 52(1):34-38.

Shami NJIE, Moreira EAM. Licopeno como agente antioxidante. *Nutrition*. 2004; 17: 227-236.

Sharma Arya M., Janke Jürgen, Gorzelniak Kerstin, Engeli Stefan, Luft Friedrich C. Angiotensin Blockade Prevents Type 2 Diabetes by Formation of Fat Cells. *Hypertension*. 2002; 40:609-611.

Sharpe RM, Frank S. Environment, lifestyle and infertility – an intergenerational issue. *Nature Cell Biology & Nature Medicine*. 2002; 4 suppl1:s33-s40.

Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology*.2007; 132(6):2169-2180.

Shenoy U, Cassis L. Characterization of renin activity in brown adipose tissue. *Am J Physiol*.1997; 272:C989-999.

Shinamura K, et al. Changes in lipid peroxide and antioxidant enzyme activities in corpora lutea during pseudopregnancy in rats. *Journal of Reproduction and Fertility*.1995; 105:253-257.

Sigmund Curt D. Divergent mechanism regulating fluid intake and metabolism by the brainrenin-angiotensin system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012; 302:R313-R320.

Sishi B, Loos B, Ellis B, Smith W, du Toit EF, Engelbrecht AM. Diet-induced obesity alters signalling pathways and induces atrophy and apoptosis in skeletal muscle in a prediabetic rat model. *Exp Physiol*. 2011; 96(2):179-193.

Strazzullo P, Galletti F. Impact of the renin–angiotensin system on lipid and carbohydrate metabolism. *Current Opin Neph and Hyper*.2004; 13:325–332.

Stone JR, Yang S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal*. 2006; 8(3-4):243-270.

Styskal J, Van Remmen H, Richardson A, Salmon AB. Oxidative stress and diabetes: what can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models? *Free Radic Biol Med*. 2012; 52(1):46-58.

Sugino N, Nakamura Y, Takeda O, Ishimatsu M, Kato H. Changes in activities of superoxide dismutase and lipid peroxide in corpus luteum during pregnancy in rats. *J Reprod Fertil*. 1993 Mar; 97(2):347-351.

Sugino N, Takiguchi S, Kashida S, Karube A, Nakamura Y, Kato H. Superoxide dismutase expression in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy. *Mol Hum Reprod*. 2000 Jan; 6(1):19-25.

Swanson HH; Bolwerk E; Brenner E. Effects of cooling in infant rats on growth, maturation, sleep patterns and responses to food deprivation. *Br J Nutr*. 1984; 52(1):139-48.

Szczepanska-Sadowska E, Paczwa P, Dobruch J. Enhanced food and water intake in rennin transgenic rats. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2003; 54(1):81-88.

Taketani T, Tamura H, Takasaki A, Lee L, Kizuka F, Tamura I, Taniguchi K, Maekawa R, Asada H, Shimamura K, Reiter RJ, Sugino N. Protective role of melatonin in progesterone production by human luteal cells. *Journal of Pineal Research*. 2011 Sep; 51(2):207-213.

Tamura H, Takasaki A, Taketani T, Tanabe M, Kizuka F, Lee L, Tamura I, Maekawa R, Asada H, Yamagata Y and Sugino N. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. *Endocrine Journal*. 2013; 60(1):1-13.

Tilg H, Moschen A.R. Role of adiponectin and PBEF/visfatin as regulators of inflammation: involvement in obesity-associated diseases. *Clinical Science*. 2008; 114:275-278.

Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev.*1993; 45:205-251.

Tomono Y, Iwai M, Inaba S, Mogi M, Horiuchi M. blockade of AT1 receptor improves adipocyte differentiation in atherosclerotic and diabetic models. *Am J Hypertens.*2008; 21:206-212.

Touyz RM. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells - implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res.* 2004; 37(8):1263-1273.

Touyz RM. Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. *Signal Redox Antioxid.* 2005; 7 (9-10):1302-1314.

Uzuelli FHP. Metabolismo de radicais livres durante o ciclo estral de ratas. Brasília, IB-UNB, 2006. (Dissertação de mestrado em Ciências da Saúde), Programa de Pós-Graduação em Ciências da saúde, Universidade de Brasília. 106p.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions.*2006; 160:1–40.

Valko M, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.*2007; 39:44–84.

Vega M, Carrasco I, Castillo T, Troncoso JL, Videla LA, Devoto L. Functional luteolysis in response to hydrogen peroxide in human luteal cells. *J Endocrinol.*1995; 147(1):177-182.

Vento PJ, Daniels D. Repeated administration of angiotensin II reduces its dipsogenic effect without affecting saline intake. *Exp Physiol.* 2010; 95(6): pp 736–745.

Voet D, Voet JG & Pratt Cw. *Fundamentos de Bioquímica.* São Paulo: Artmed, 2000.

Voigt JP, Bramlage P, Fink H. Hypophagic effect of the angiotensin AT1 receptor antagonist irbesartan in rats. *Eur J Pharmacol.*2007; 564(1-3):131-7.

Wang GJ, Volkow ND, Fowler JS. The role of dopamine in motivation for food in humans: implications for obesity. *Expert Opin Ther Targets.*2002; 6(5):601-9.

Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.*1981; 7:325-33.

Whitebread S, Mele M, Kamber B, de Gasparo M. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun.*1989; 163:284-291.

Wu S, Divall S, Wondisford F, Wolfe A. Reproductive Tissues Maintain Insulin Sensitivity in Diet-Induced Obesity. *Diabetes.*2012; 61:114–123.

Yamamoto R, Akazawa H, Fujihara H, Ozasa Y, Yasuda N, Ito K, Kudo Y, Qin Y, Ueta Y, Komuro I. Angiotensin II Type 1 Receptor Signaling Regulates Feeding Behavior through Anorexigenic Corticotropin-releasing Hormone in Hypothalamus. *The Journal of Biological Chemistry.*2011; 286(24): 21458–21465.

Yasue S, Masuzaki H, Okada S, Ishii T, Kozuka C, Tanaka T, Fujikura J, Ebihara K, Hosoda K, Katsurada A, Ohashi N, Urushihara M, Kobori H, Morimoto N, Kawazoe T, Naitoh M, Okada M, Sakaue H, Suzuki S, Nakao K. Adipose Tissue-Specific Regulation of Angiotensinogen in Obese Humans and Mice: Impact of Nutritional Status and Adipocyte Hypertrophy. *Am J Hypertens.*2010; 23(4):425–431.

Yoshimura Y, Karube M, Koyama N, Shiokawa S, Nanno T, Nakamura Y. Angiotensin II directly induces follicle rupture and oocyte maturation in the rabbit. *FEBS Lett.*1992; 307:305-308.

Yoshimura Y, Karube M, Oda T, Koyama N, Shiokawa S, Akiba M, Yoshinaga A, Nakamura Y. Locally produced angiotensin II induces ovulation by stimulating prostaglandin production in in vitro perfused rabbit ovaries. *Endocrinology.*1993; 133:1609-1616.

Yoshimura Y. The ovarian renin-angiotensin system in reproductive physiology. *Front Neuroendocrinol.*1997; 18:247–291.

Yoshida T, Semprun-Prieto L, Wainford RD, Sukhanov S, Kapusta DR, and Delafontaine P. Angiotensin II reduces food intake by altering orexigenic neuropeptide expression in the mouse hypothalamus. *Endocrinology.*2012; 153: 1411–1420.

Yvan-charvet L, Quinard-Boulangé A. Role of adipose tissue rennin-angiotensin system in metabolic and inflammatory diseases associated. *Kidney International.*2011; 79:162-168.

Zimmerman MC, Lazartigues E, Lang JA, Sinnayah P, Ahmad IM, Spitz DR, Davisson RL. Superoxide Mediates the Actions of Angiotensin II in the Central Nervous System. *Circ Res - Journal of the American Heart Association.*2002; 91(11):1038-1045.