



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Jorge Luiz Alves Pereira

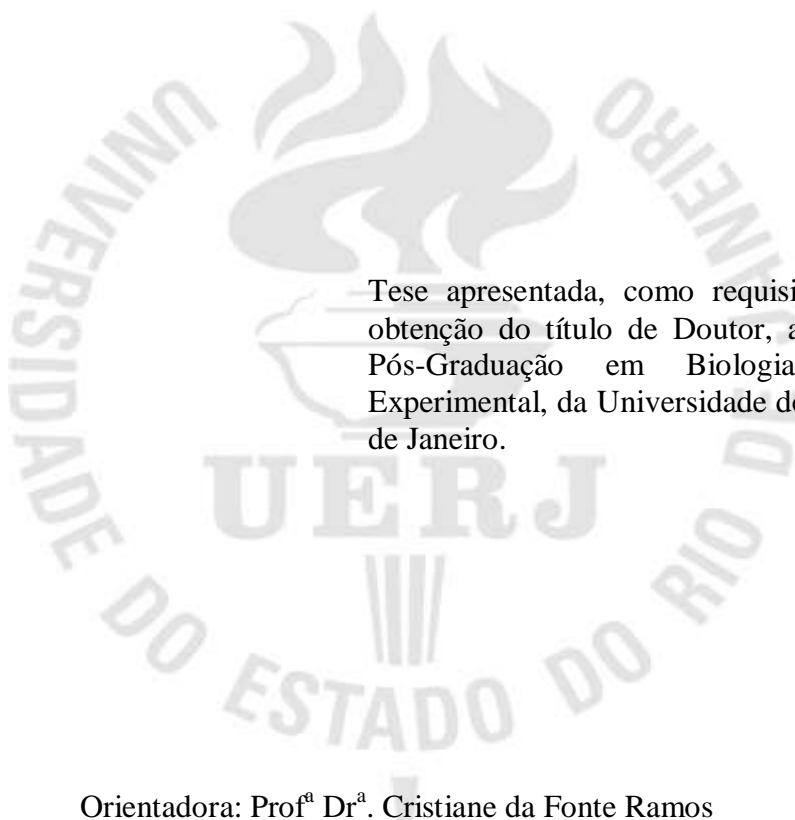
Estudo dos efeitos da dieta de alta densidade energética sozinha ou combinada a bloqueadores do sistema renina angiotensina sobre os testículos de camundongos.

Rio de Janeiro

2015

Jorge Luiz Alves Pereira

Estudo dos efeitos da dieta de alta densidade energética sozinha ou combinada a bloqueadores do sistema renina angiotensina sobre os testículos de camundongos.



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Cristiane da Fonte Ramos

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

P436 Pereira, Jorge Luiz Alves.

Estudo dos efeitos da dieta de alta densidade energética sozinha ou combinada a bloqueadores do sistema renina angiotensina sobre os testículos de camundongos. / Jorge Luiz Alves Pereira – 2015.
71 f.

Orientadora: Cristiane da Fonte Ramos.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Hipertensão - Modelos animais - Teses. 2. Hipertensão - Aspectos nutricionais. 3. Hipercolesterolemia - Fisiopatologia. 4. Estereologia - Teses. 5. Sistema renina-angiotensina - Teses. 6. Testículos - Teses. 7. Enalapril - Farmacologia . I. Ramos, Cristiane da Fonte. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.12: 611.631

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Jorge Luiz Alves Pereira

Estudo dos efeitos da dieta de alta densidade energética sozinha ou combinada a bloqueadores do sistema renina angiotensina sobre os testículos de camundongos.

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2015.

Banca Examinadora:

Prof^a Dr^a. Cristiane da Fontes Ramos
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Márcio Antônio Babinski
Univesidade Federal Fluminense

Prof. Dr. João Paulo Martins de Carvalho
Núcleo Estadual do Ministério da Saúde /RJ

Prof. Dr. Jorge José de Carvalho
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof^a Dr^a. Sandra Barbosa da Silva
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese a minha esposa Pamela da Motta e aos meus filhos, Lucas e Arthur, com a esperança de que entendam, um dia, as minhas muitas ausências. Conscientemente, sacrifiquei por este trabalho acadêmico o tempo que poderia ter dedicado a vocês, mas tenho a mais absoluta certeza que foi por uma boa causa.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Cristiane da Fonte Ramos por ter me aceitado e me ajudado (mais uma vez) durante todo esse período. Acreditar em mim quando eu achei difícil acreditar em mim mesmo, dizer algumas vezes, o que eu realmente precisava ouvir, em vez do que eu queria que ela dissesse.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, prof^º. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda por cuidar extremamente da qualidade do curso, por sempre ter sido honesto comigo, gentil e presente todas as vezes que precisei, por ter me ensinado muito mais do que “ciência”, mostrando-me que existe sempre um outro lado a considerar.

Aos docentes do Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doenças Cardiovasculares, Departamento de Anatomia Humana da UERJ, por incentivarem aos alunos prosseguirem todos os dias com a pesquisa.

A prof^ª. Dr^ª. Eliete Dalla Corte Frantz por ter dividido comigo esse trabalho, pelo companheirismo, amizade e sua incessante vontade em ajudar.

Aos amigos: Aline Penna, André Vianna, Eduardo Leze, Fernando Serra, Jorge Luiz Medeiros Júnior, Thatiany Marinho, Thereza Bargut e Willian Lannes. Pelo companheirismo, carinho, força dada em todos os momentos que precisei e pelos ensinamentos que foram importantes no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Victor Motta por toda sua ajuda nos momentos de aperto, dúvidas e soluções "digitais", e por toda conversa jogada fora pelos corredores que motivaram muitas risadas.

As técnicas do Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doenças Cardiovasculares: Gezileia Lau e Michele Soares. Por toda a colaboração e pelos momentos felizes de descontração.

Ao Laboratório de Histocompatibilidade da UERJ pela concessão da bolsa de estudo através do edital: CAPES PRO-ENSINO-SAUDE 1654/2011.

As agências de fomento que de maneira direta e/ou indiretamente ajudaram com suporte financeiro para a realização desse trabalho: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Sempre alimentei um grande desejo de diferenciar o verdadeiro do falso, para ver com clareza minhas ações e caminhar com segurança nessa vida.

René Descartes

A sorte favorece a mente bem preparada.

Louis Pasteur

As pessoas estão sempre culpando as circunstâncias pelo que elas são. Eu não acredito em circunstâncias. As pessoas que progredem nesse mundo são as pessoas que se levantam e procuram pelas circunstâncias que elas querem, e, se elas não conseguem encontrá-las, elas mesmas as fazem.

George Bernard Shaw

RESUMO

Alves-Pereira, Jorge Luiz. *Estudo dos efeitos da dieta de alta densidade energética sozinha ou combinada a bloqueadores do sistema renina angiotensina sobre os testículos de camundongos*. 2015. 71f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é considerada um fator de risco para a saúde reprodutiva masculina e tem o potencial de alterar a espermatogênese (produção de espermatozoides) e a esteroidogênese (produção de andrógeno), além de promover importantes alterações morfológicas no órgão. O objetivo do presente estudo foi avaliar se drogas anti-hipertensivas que bloqueiam o sistema renina angiotensina (SRA) em diferentes níveis possui efeitos sobre a esteroidogênese e a morfologia testicular de camundongos hipertensos devido a ingestão de uma dieta de alta densidade energética (HED). Camundongos C57BL/6 foram alimentados com a dieta HED durante oito semanas e posteriormente tratados com alisquireno (50 mg/kg/dia), enalapril (30 mg/kg/dia) ou losartana (10 mg/kg/dia) por um período adicional de seis semanas. A pressão arterial sistólica (PAS) foi avaliada quinzenalmente e ao término do experimento todos os animais foram sacrificados por sobredose anestésica. As amostras foram testadas quanto sua homocedasticidade e as diferenças entre os grupos foram testadas pela análise de variância *one-way* (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Holm-Sidak e em todos os casos, o nível de significância adotado foi de $P \leq 0,05$. A dieta HED levou a um aumento significativo na PA ($P < 0,05$). Após a administração dos respectivos medicamentos, todos os tratamentos resultaram na normalização da PAS. O perfil lipídico de todos os grupos alimentados com dieta HED apresentaram aumento significativo. Em relação à função reprodutiva, ocorreu uma diminuição significativa da testosterona, estradiol e do hormônio luteinizante (LH) séricos, a expressão gênica e proteica da enzima aromatase, do receptor do hormônio luteinizante (LH-r) e da *steroidogenic acute regulatory protein* (StAR). Além disso, a expressão proteica da enzima conversora da angiotensina (ECA), do receptor tipo 1 da Ang II (AT1R) e da renina também foram significativamente diminuídos nos grupos que receberam a dieta HED. Dentre os tratamentos, apenas o enalapril foi capaz de reverter as alterações. Além disso, a expressão proteica da ECA, AT1R e da renina foram mais baixos em todos os grupos HED, exceto no grupo que recebeu o enalapril. Os grupos que receberam dieta HED também apresentaram alterações morfológicas, sendo o enalapril o único capaz de reverter essas alterações. Como apenas o inibidor da ECA foi capaz de reverter as alterações hormonais e morfológicas testiculares causadas pela dieta de alta densidade energética podemos sugerir que o enalapril deve ser a droga de escolha para pacientes que apresentem disfunção reprodutiva anterior.

Palavras-chave: Dieta. Estereologia. Hipercolesterolemia. Hipertensão. Morfometria. Sistema renina-angiotensina. Testículos.

ABSTRACT

Alves-Pereira, Jorge Luiz. *Effects of high energy density diet alone or in combination with blockers of the renin angiotensin system in testis of mice*. 2015. 71f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Hypertension is considered a risk factor for male reproductive health and has the potential to change the spermatogenesis (sperm production) and steroidogenesis (androgen production), and promote important morphological changes in the body. The aim of this study was to evaluate whether the anti-hypertensive drugs that block the renin-angiotensin system (RAS) at different levels have effects on the steroidogenesis and testicular morphology in hypertensive mice due to ingestion of a high energy density (HED) diet. Mice C57BL6 were fed a diet HED for eight weeks and then treated with aliskiren (50 mg/kg/day), enalapril (30 mg/kg/day) or losartan (10 mg/kg/day) for an additional six weeks. Blood pressure (BP) was evaluated every two weeks until the end of experiment and all animals were sacrificed by anesthetic overdose. Differences between groups were tested by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Holm-Sidak post-test and in all cases, the significance level was set at $P \leq 0.05$. The high energy density diet led to a significant increase in BP ($P < 0.05$). After administration of the medication, all treatments resulted in normalization of BP. The lipidic profile of all groups fed HED diet showed a significant increase. Regarding reproductive function, there was a significant decrease in testosterone and estradiol serum levels, gene and protein expression of the aromatase enzyme, the luteinizing hormone receptor (LH-r), and steroidogenic acute regulatory protein (StAR). Furthermore, the expression of the protein angiotensin converting enzyme (ACE), receptor type 1 Ang II (AT1R) and renin were significantly decreased in the groups that received the HED diet. Among the treatments, only enalapril was able to reverse the changes. Furthermore, ACE, renin and AT1R protein expression were lower in all HED groups but the group treated with enalapril. The groups that received HED diet also presented morphological changes, and once again only enalapril could reverse these changes. As the ACE inhibitor was the only one able to reverse the hormonal and testicular morphological alterations caused by high energy density diet we could suggest that enalapril should be the drug of choice for patients who present reproductive dysfunction prior treatment.

Keywords: Diet. Hypercholesterolemia. Hypertension. Morphometry. Renin-angiotensin system. Stereology. Testis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Principais componentes do SRA	20
Figura 2 -	Ilustração do sistema genital masculino	25
Figura 3 -	Controle hormonal da espermatogênese e ações da testosterona e dihidrotestosterona	28
Figura 4 -	Via biossintética de esteróides nos testículos	30
Figura 5 -	SRA nos testículos	32
Tabela 1 -	Composição das dietas experimentais	35
Tabela 2 -	Sequência dos <i>primers</i> utilizados para as amplificações na técnica de PCR em tempo real	37
Tabela 3 -	Anticorpos utilizados na técnica de <i>western blott</i>	38
Figura 6 -	Técnica estereológica para quantificação da densidade por área (Q_a) dos túbulos seminíferos	40
Figura 7 -	Técnica morfométrica para mensuração do diâmetro dos túbulos seminíferos e altura do epitélio	42
Figura 8 -	Pressão arterial sistólica	43
Figura 9 -	Perfil lipídico de colesterol e triglicerídeos	44
Figura 10 -	Testosterona sérica, estradiol sérico e LH	45
Figura 11 -	Expressão gênica da aromatase, LH-r e StAR	46
Figura 12 -	Expressão proteica da aromatase, LH-r e StAR	47
Figura 13 -	Expressão proteica da ECA, AT1R e da renina	48
Figura 14 -	Dados da avaliação morfométrica e estereológica do testículo	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
AIN-93	<i>American Institute of Nutrition</i> do ano de 1993
ANOVA	Análise de variância <i>one-way</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ALTITUDE	<i>Aliskiren Trial in Type 2 Diabetes Using Cardio-Renal Endpoints</i>
Ang	Angiotensina II, III, IV, (1-7), (1-9)
AT1R	Receptor tipo 1 da Ang II
AT2R	Receptor tipo 2 da Ang II
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
ECA	Enzima conversora de angiotensina 1 e 2
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EP	Endopeptidase
EPM	Erro padrão da média
ER	Receptor de Estrógeno
FSH	Hormônio folículo estimulante
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HED	Dieta <i>high energy density</i>
HED-A	Dieta <i>high energy density</i> e alisquireno
HED-E	Dieta <i>high energy density</i> e enalapril
HED-L	Dieta <i>high energy density</i> e losartana
kg -	Quilogramas
kDA	Kilodalton
LH	Hormônio luteinizante
LH-r	Receptor do hormônio luteinizante
MAS	Receptor MAS
mg	miligramas

mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAS	Pressão arterial sistólica
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
RIPA	Tampão de lise radio imunoprecipitação
RNA	Ácido ribonucleico
SC	Dieta <i>standard chow</i>
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
StAR	<i>Steroidogenic acute regulatory protein</i>
TBP	Proteína de ligação TATA Box

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
\leq	Menor ou igual
\pm	Mais ou Menos
$\text{\textcircled{R}}$	Marca registrada

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	DIETA DE ALTA DENSIDADE ENERGÉTICA	14
1.1	Dieta, obesidade e sobrepeso	15
1.2	Hipertensão arterial sistêmica (HAS)	16
1.3	Sistema renina angiotensina (SRA)	17
1.3.1	<u>Bloqueadores do SRA utilizados no estudo</u>	22
1.3.1.1	Alisquireno	22
1.3.1.2	Enalapril	23
1.3.1.3	Losartana	24
1.4	Sistema genital masculino	25
1.4.1	<u>Testículos</u>	26
1.4.1.1	Espermatogênese	27
1.4.1.2	Esteroidogênese	29
1.4.1.3	SRA nos testículos	31
2	OBJETIVOS	33
2.1	Geral	33
2.2	Específicos	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	Comitê de ética	34
3.2	Modelo experimental	34
3.3	Pressão arterial sistólica (PAS)	36
3.4	Análise sérica	36
3.5	PCR em tempo real	37
3.6	Western Blott	38
3.7	Estereologia do testículo	40
3.8	Morfometria do testículo	41
3.9	Análise estatística	42
4	RESULTADOS	43
5	DISCUSSÃO	51
	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS	56

APÊNDICE A - Artigo científico publicado	68
APÊNDICE B - Ficha catalográfica de cartilha educativa da linha de ensino em saúde	69
ANEXO A - Comitê de ética em pesquisa	70
ANEXO B - Confirmação de submissão do segundo artigo científico	71

INTRODUÇÃO

Densidade energética refere-se à quantidade de energia num determinado peso de alimento (quilojoules por grama ou kcal por grama) (1). O consumo dessas dietas com alta densidade energética estão relacionados com a elevada prevalência de dislipidemia, aterosclerose e hipertensão (2, 3). Estudos têm associado a hipertensão com disfunção erétil, diminuição da libido e ejaculação (4, 5), porém sua natureza permanece complexa e controversa.

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) tornou-se uma preocupação crescente de saúde pública, particularmente em países em desenvolvimento, com uma prevalência estimada de 37% da população adulta, em comparação com 22% em nações industrializadas (6). Estima-se que no Brasil tenha diminuído aproximadamente 6% nas últimas três décadas, mas ainda afeta 30% da população adulta no país (7).

O sistema renina-angiotensina (SRA) circulante desempenha um papel importante no controle da pressão sanguínea e no equilíbrio eletrolítico do organismo, e conseqüentemente, na patologia da hipertensão, agindo principalmente através dos efeitos da angiotensina (Ang) II (Ang II) através do receptor do tipo 1 da angiotensina II (AT1R) (8). O SRA clássico conhecido por décadas pela ação do seu peptídeo Ang II na regulação do equilíbrio hidroeletrólítico e da função cardiovascular, tem sofrido substanciais alterações conceituais, deixando de ser uma cascata linear de proteólises limitadas para se tornar um sistema complexo, com múltiplos receptores e mediadores (9).

O conceito clássico do SRA, como um regulador do sistema endócrino da função renal e cardiovascular sofreu uma mudança (10, 11). A identificação de vários componentes do SRA, como a pro-renina, renina, angiotensinogênio, Ang I, Ang II, enzima conversora de angiotensina (ECA) e da ECA 2, nos testículos e epidídimo de seres humanos e mamíferos (12-16) indica fortemente a existência de um SRA local envolvido na reprodução masculina (17). No aparelho reprodutor masculino, o papel do SRA local parece possuir grande importância para a fertilidade (18).

Os testículos fazem parte do sistema reprodutor masculino, e é a glândula onde o espermatozóide e a testosterona são produzidos. Estão contidos no escroto e são compostos de tecido conjuntivo denso, contendo cerca de três centenas de compartimentos internos chamados lóbulos. Cada um desses lóbulos contém um número de pequenos túbulos altamente enrolados em que o espermatozóide é produzido, a testosterona é produzida em células localizadas na zona entre os lóbulos.

1 DIETA DE ALTA DENSIDADE ENERGÉTICA

Um possível indicador da qualidade da dieta, é a densidade energética. Esta exerce importante papel no consumo de alimentos e energia, por atuar na regulação da ingestão energética, e, a longo prazo no peso corporal dos indivíduos (19). A densidade energética é definida como a energia disponível por unidade de peso (Quilojoules/g ou Quilocalorias/g) e relaciona-se à quantidade de água nos alimentos. Esses alimentos com elevada quantidade de água em sua composição, como frutas, legumes e verduras, apresentam baixa densidade energética, enquanto os com baixa quantidade de água, tais como farinhas, grãos, açúcar, óleos e manteiga, possuem alta densidade energética (20). Em termos práticos, dietas compostas por alimentos ricos em lipídios, carboidratos simples, com baixo conteúdo de água e de fibras, apresentam alta densidade energética (21). Assim, o aumento da densidade energética favorece o ganho de peso e o aumento na prevalência de excesso de peso (3).

Em termos de recomendação para a densidade energética da dieta, o que se tem é um valor proposto pelo *World Cancer Research Fund*, o qual recomenda que, como estratégia para prevenção de ganho de peso e meta de saúde pública, a dieta deve ter 1,25 kcal/g, considerando no cálculo, apenas a inclusão de alimentos.

O aumento na prevalência do excesso de peso está associado a mudanças no padrão da alimentação. A evolução temporal da disponibilidade domiciliar de alimentos nas áreas metropolitanas do Brasil, considerando o período 1974-2008, evidenciou variações importantes na composição da dieta, seja na distribuição de macronutrientes ou na participação relativa de alimentos. Destaca-se ainda o aumento da proporção de gorduras e diminuição de carboidratos na dieta, além de maior participação de embutidos, óleos e gorduras vegetais, biscoitos, refeições prontas, açúcar e refrigerantes. Enquanto a participação de frutas e hortaliças permaneceu relativamente constante durante todo o período, com valores muito aquém das recomendações (22, 23).

As maiores disponibilidades de alimentos de alta densidade energética assim como hábitos de vida sedentários introduziram uma nova ameaça à sobrevivência humana: a obesidade e suas comorbidades (24).

1.1 Dieta, obesidade e sobrepeso

No contexto do crescimento da epidemia da obesidade (25), tem sido sugerido que o aumento da disponibilidade energética e, portanto, o consumo de energia (26), independentemente de alterações na atividade física, são suficientes para explicar os aumentos observados na massa corporal a nível da população (27). Sabe-se que o sobrepeso e a obesidade podem ser atribuídas em parte, ao maior acesso aos alimentos industrializados, que acompanha a urbanização, juntamente com a falta de informação adequada, que induz a erros alimentares como o aumento do consumo de alimentos ricos em sal e gorduras (28).

Existe atualmente uma crescente preocupação mundial com o aumento da prevalência de sobrepeso e obesidade (índice de massa corporal $\geq 25\text{kg/m}^2$ e $\geq 30\text{kg/m}^2$, respectivamente) (29). Considerada atualmente como epidemia, a obesidade vem crescendo de forma alarmante tanto nos países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento, acarretando enormes prejuízos à sociedade (30). É uma doença crônica caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, podendo por si só contribuir para o desenvolvimento de comorbidades como diabetes, hipertensão, doenças coronarianas, dislipidemias e outras que contribuem de forma importante para reduzir a qualidade e a expectativa de vida. É reconhecido que os fatores genéticos têm um papel importante sobre a obesidade, porém é necessário analisar o comportamento e o ambiente em que a família se encontra, pois se estes não forem controlados, podem tornar o indivíduo mais suscetível a essa doença (31). Acredita-se que os fatores ambientais e comportamentais - sedentarismo e excesso de energia consumida - sejam os mais relevantes na incidência da obesidade do que os fatores genéticos (32, 33).

Estudos indicam que o excesso de tecido adiposo, principalmente na região abdominal, está intimamente relacionado ao risco de desenvolvimento de doença arterial coronariana, HAS, *diabetes mellitus* (DM) e dislipidemias (34, 35). E essa associação eleva-se a medida que o índice de massa corporal aumenta (36). A maior parte dessas doenças está relacionada à ação do tecido adiposo como órgão endócrino, uma vez que os adipócitos sintetizam diversas substâncias como adiponectina, glicocorticoides, fator de necrose tumoral alfa, hormônios sexuais, interleucina-6 e a leptina, que atuam no metabolismo e controle de diversos sistemas (37, 38).

Obesidade e HAS estão intimamente relacionados, sendo sua prevalência cerca de 50% maior nos indivíduos obesos. Além disso, o ganho de peso pode causar elevação da HAS e, ao contrário, a redução de peso pode diminuir a HAS. No entanto, os mecanismos

fisiopatológicos que favorecem o desenvolvimento de HAS na obesidade são complexos e multifatoriais. Dentre estas alterações destacam-se alterações hemodinâmicas sistêmicas e renais, resistência à insulina com hiperinsulinemia compensatória, ativação do sistema nervoso simpático e do SRA e efeitos da leptina plasmática (39, 40).

1.2 Hipertensão arterial sistêmica (HAS)

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares são as principais causadoras de morte, estando a HAS entre uma das doenças responsáveis (41). A HAS é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados da pressão arterial sistólica (PAS). Associa-se frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, com conseqüente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais (42).

A HAS tem alta prevalência e baixas taxas de controle. É considerada um dos principais fatores de risco modificáveis e um dos mais importantes problemas de saúde pública. Em 2001, cerca de 7,6 milhões de mortes no mundo foram atribuídas à elevação da PAS (54% por acidente vascular encefálico e 47% por doença isquêmica do coração), sendo a maioria em países de baixo e médio desenvolvimento econômico e mais da metade em indivíduos entre 45 e 69 anos. Em nosso país, as doenças cardiovasculares têm sido a principal causa de morte, entre 1990 a 2006, observou-se uma tendência lenta e constante de redução dessa taxa (42).

Dentre os fatores que predisõem para o surgimento da HAS incluem-se: idade, que está relacionada ao envelhecimento, na qual a musculatura e o tecido de revestimento dos vasos sofrem alterações, porém estas não descartam a possibilidade desta doença em crianças e adolescentes; sexo, aspecto que atinge em sua maioria os homens; etnia, a incidência é maior em negros, principalmente na faixa etária entre 35 a 44 anos. Entre outros, como: fatores sócio-econômicos, dislipidemias, DM, obesidade, apnéia obstrutiva do sono, consumo abusivo de sódio, gorduras e álcool, tabagismo, estresse, uso de contraceptivos e sedentarismo (43, 44).

O processo de aparecimento da HAS depende da relação entre fatores genéticos e ambientais, no entanto não sabe-se claramente como estas interações acontecem. Sobretudo,

sabe-se que está associada a modificações funcionais do SRA, do sistema nervoso autônomo simpático, além da disfunção endotelial e outros mecanismos humorais (45).

A principal finalidade do tratamento anti-hipertensivo é prevenir a morbidade e reduzir a mortalidade cardiovascular associadas à HAS. A eficácia dos medicamentos anti-hipertensivo hoje disponíveis está bem determinada. O tratamento não medicamentoso também reduz a PAS, e se associado ao uso de medicamentos pode melhorar a sua eficácia. Para o tratamento da HAS deve se considerar, portanto: mudanças de estilo de vida ou tratamento não medicamentoso e a instituição de tratamento medicamentoso (46-48).

Os fármacos utilizados para a diminuição da PAS são: diuréticos, inibidores adrenérgicos (principalmente α e β bloqueadores), inibidores dos canais de cálcio, inibidores da ECA, bloqueadores do AT1R, inibidores direto da renina e vasodilatadores direto (42).

O SRA é alvo constante para o tratamento da HAS. Tem sido atribuído papel relevante à hiperatividade desse sistema na fisiopatologia e etiologia da obesidade, DM2 e sintomas da síndrome metabólica (49). Isso faz com que os bloqueadores do SRA, seja, uma das classes de escolha para o tratamento de pacientes hipertensos devido à sua ampla gama de benefícios cardiovasculares e efeitos pleiotrópicos (50).

Disfunção sexual inclui problemas relacionados ao libido, orgasmo, ejaculação e, na maioria das vezes, a ereção (51). É um problema de saúde pública, de grande prevalência global em homens e mulheres (52, 53), que se relaciona com as principais doenças cardiovasculares e metabólicas, como HAS, doença arterial coronariana e insuficiência cardíaca (54, 55).

1.3 Sistema renina angiotensina (SRA)

Em 1898, Tiegerstedt e Bergman iniciaram as descobertas do SRA, e, trabalhos posteriores, mais precisamente em 1940 e 1950, reconheceram e demonstraram a sua ação. O SRA foi pensado como um sistema endócrino pelo qual o rim influencia a regulação cardiovascular sistêmica e o balanço hidroeletrólítico (56). No início da década de 1970 foram descobertos peptídeos que inibem a formação de Ang II, assim revelando importantes funções fisiológicas e fisiopatológicas desempenhadas pelo SRA, o que permitiu se estender muito além do conceito inicial.

O conceito atual é que o SRA desempenha um importante papel na regulação da PAS, equilíbrio hidroeletrólítico, estruturação e função cardiovascular (57). A maior parte de suas ações fisiológicas é exercida pela Ang II, um potente peptídeo biológico, que está relacionado com a etiologia da HAS e outras formas de doenças cardiovasculares e renais (58). Várias consequências hemodinâmicas e humorais têm sido relacionadas à ativação do SRA, como isquemia miocárdica, hipertrofia ventricular esquerda, arritmias, aumento do estresse oxidativo, insuficiência cardíaca congestiva, hipertrofia vascular, além, das alterações renais (59).

No SRA clássico sistêmico, a formação da Ang II envolve uma série de clivagens proteolíticas sequenciais do angiotensinogênio (Figura 1), uma proteína derivada principalmente da zona pericentral dos lóbulos hepáticos, que circula como um peptídeo biológico inativo. O angiotensinogênio circulante sofre ação da renina, sendo desdobrado no decapeptídeo Ang I. A renina é a principal limitante da taxa de produção de Ang II, uma enzima sintetizada e armazenada sob a forma inativa, denominada pró-renina, nas células justaglomerulares dos rins e ativada pela queda da PAS (56).

A Ang I é desprovida de ação vascular, mas ao sofrer hidrólise através da ação da ECA, têm-se o octapeptídeo ativo Ang II. A ECA é uma metaloprotease de ligação de membrana, predominantemente encontrada no endotélio dos vasos dos pulmões (60). Esta enzima também causa a degradação da bradicinina, o principal efetor do sistema caliceína-cinina, devido a sua semelhança com a cininase II. A bradicinina é um potente peptídeo vasodilatador e cardioprotetor, que estimula a liberação de outros vasodilatadores importantes, como o óxido nítrico, prostaciclina e fator hiperpolarizante derivado do endotélio, proporcionando inclusive benefícios endoteliais contra remodelação, aterosclerose e trombose, através dos receptores B1 e B2 (Figura 1) (61, 62).

O gene da ECA resulta em duas diferentes proteínas devido ao uso de diferentes promotores formados durante a duplicação genética. Estudos recentes demonstraram a expressão gênica da ECA em diferentes tecidos, tendo sido possível identificar duas formas distintas de ECA: a ECA somática (ECA), produzida no endotélio vascular e em outros epitélios, e a ECA testicular (ECA_t), expressa quase exclusivamente nos testículos e que tem um papel crucial na formação dos espermatozoides, e com traços de expressão no jejuno, pâncreas e baço (63, 64).

A ECA somática é uma proteína com dois domínios homólogos e dois sítios catalíticos. Deleção no gene alvo da ECA somática, em camundongos, causa hipotensão, desenvolvimento impróprio dos rins e redução da fertilidade em machos (65). A isoforma

somática apresenta massa molecular de 150 a 180 kDa, sendo expressa em células endoteliais, epiteliais e neuronais (66).

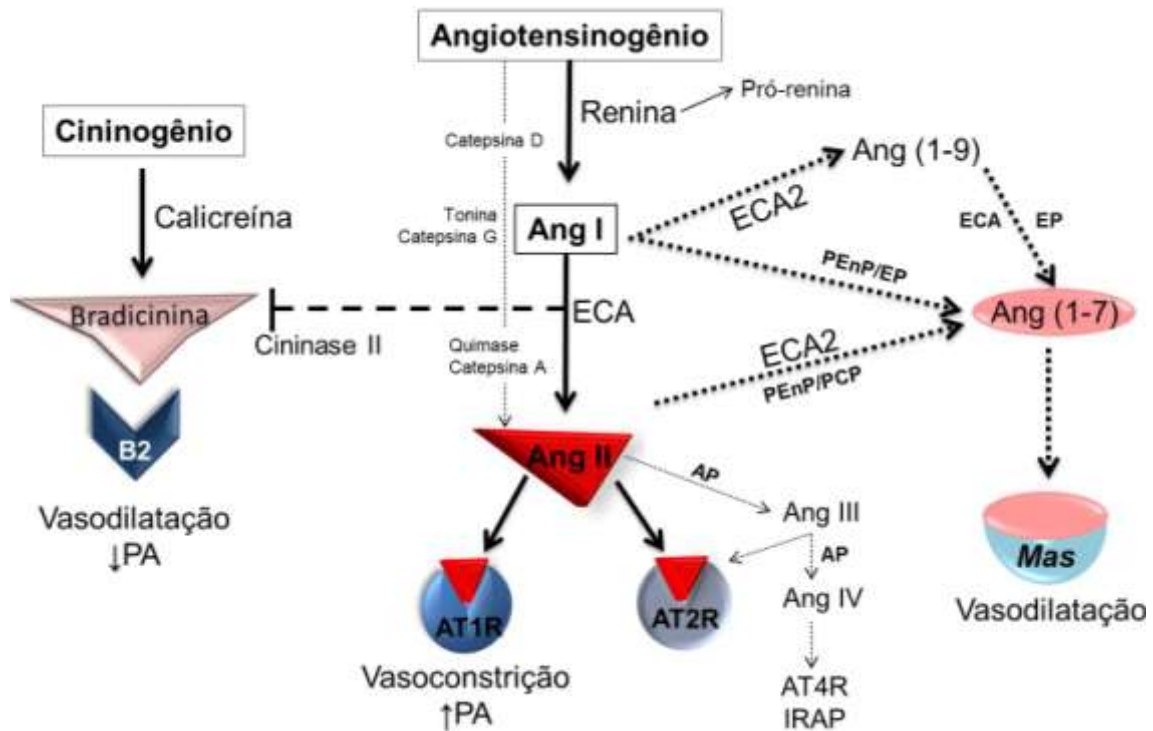
A ECA é capaz de hidrolisar uma variedade enorme de peptídeos biologicamente ativos, além da angiotensina I e da bradicinina. Dentre estes substratos estão o hormônio luteinizante (LH) (67), Ang (1-7) e a neurotensina (68).

Mais recentemente, dois grupos publicaram trabalhos paralelos e independentes, revelando um novo gene homólogo humano da ECA, que foi chamado de ECA 2 (69) ou ECAH (70) localizada no cromossomo Xp22. Trata-se de uma carboxipeptidase, associada à membrana e que é expressa predominantemente pelo endotélio e que não sofre a ação dos inibidores da ECA. É altamente expressa nos testículos, tecidos renais e cardiovasculares, e tecidos gastrointestinal (71). Diferentemente do que ocorre com a ECA, a ECA 2 não é inibida pelo lisinopril ou captopril (69). Em relação ao SRA, a ECA 2 somente hidrolisa com alta eficiência catalítica a Ang II. Outros componentes do SRA, como a Ang I, Ang (1-5), Ang (1-7) e Ang (1-9), são pobremente ou não são hidrolisadas pela ECA 2. Evidências bioquímicas indicam que a ECA e a ECA 2 podem ter funções complementares. Assim, a ECA gera a Ang II e a ECA 2, por sua vez degrada a Ang II em Ang (1-7) (72), cujos os efeitos vasodilatadores e anti-hipertensivos são contrarreguladores das ações da Ang II (70). A relevância fisiológica e fisiopatológica dessa enzima tem sido documentada experimentalmente por vários grupos (73).

Após sua síntese, a Ang II se liga aos receptores do tipo 1 da Ang II (AT1R) ou do tipo 2 (AT2R), sendo que o AT1R confere as ações clássicas da Ang II (Figura 1), pelo aumento da atividade do sistema nervoso simpático e da resistência vascular periférica, causando vasoconstrição e aumento da PAS, liberação de aldosterona suprarrenal e retenção de sódio e água (74). Em adição aos seus efeitos no sistema cardiovascular, tem-se demonstrado que a Ang II está envolvida em outras funções, tais como proliferação e apoptose celular, geração de espécies reativas de oxigênio e secreção hormonal (59).

Por outro lado, a ativação de AT2R antagoniza as ações de AT1R em muitos aspectos, com propriedades vasodilatadora e inibidora da angiogênese (59). Sabe-se que o AT2R desempenha papel importante no feto e em adultos, em resposta a injúrias, com inibição do crescimento e promoção da diferenciação celular, do reparo tecidual, apoptose e proteção contra isquemia (74). Porém, este antagonismo não pode ser generalizado, pois os subtipos de receptores para Ang II apresentam estruturas genômicas e localizações diferentes, além de expressão e regulação específicas para cada tecido.

Figura 1 - Principais componentes do SRA



Nota: As setas cheias indicam a estimulação, as setas pontilhadas indicam vias alternativas e a linha interrompida indica inibição.

Legenda: Ang = angiotensina; ECA = enzima conversora de angiotensina; AT1R = receptor tipo 1 da Ang II; AT2R = receptor tipo 2 da Ang II; AT4R = receptor tipo 4 da Ang II; EP = endopeptidase; PEnP = propilendopeptidase; PCP = propilcarboxipeptidase; AP = aminopeptidase; PA = pressão arterial (75).

Fonte: FRANTZ, 2014, f. 32.

Na figura 1, ainda são descritas outras vias para formação de Ang II, não dependentes da ECA ou da renina, incluindo quimases, catepsinas e toninas. Não há conhecimento das consequências funcionais sobre essas vias alternativas, mas parece haver implicações fisiopatológicas (76).

A Ang II pode se ligar aos seus receptores ou ainda pode ser clivada para se obter produtos de degradação, e alguns destes são, eles próprios, outros peptídeos biologicamente ativos, com papéis integrantes na regulação da energia e da homeostase da glicose e cardiovascular. O heptapeptídeo Ang (1-7) pode ser formado a partir da Ang I de duas formas: diretamente, através de hidrólises pela propilendopeptidase e endopeptidase; ou indiretamente, mediante a ação da ECA 2, uma homóloga da ECA (69), formando o composto intermediário Ang (1-9), que é novamente metabolizado pela ECA ou endopeptidase, finalmente formando a Ang (1-7) (77). De forma mais abundante, a Ang (1-7) é diretamente

formada a partir da Ang II, pela atividade catalítica de ECA 2 (69), ou ainda, pela atividade de propilendopeptidase e propilcarboxipetidase (78), tal como representado na Figura 4.

A Ang (1-7) confere suas ações através da ativação do receptor acoplado à proteína G, denominado receptor *Mas* (Figura 4), promovendo liberação de óxido nítrico e aumento da ação da bradicinina, resultando em vasodilatação, diurese, efeitos anti-angiogênicos, antitrombóticos e antiproliferativos (79). Suas ações tornam evidente a existência de um eixo contrarregulador aos efeitos vasoconstritores e proliferativos da Ang II, formado pela via ECA 2 → Ang (1-7) → receptor *Mas* (80). Portanto, o SRA pode ser visto como um sistema de função dupla no qual suas ações são primariamente dirigidas pelo balanço entre ECA e ECA 2 (78).

No entanto, o papel de Ang (1-7) não está limitado à ação contrarreguladora. Na verdade, a eliminação genética e ou bloqueio farmacológico do receptor *Mas* produz um fenótipo que inclui disfunção cardíaca e endotelial, aumento da PA, diminuição dos barorreflexos e da espermatogênese, alterações acentuadas no metabolismo de lipídios e da glicose (81, 82). A maioria destas observações é corroborada pelos dados obtidos em camundongos com deficiência de ECA 2 (83). Ressaltando-se que, diferentemente da ECA, a ECA 2 não é inibida pelo uso de inibidores da ECA, e também não interfere na degradação de bradicinina (69).

Outro aspecto da complexidade dos produtos ativos do SRA é que podem ser novamente clivados por amino, carbóxi ou endopeptidases. A hidrólise da Ang II por aminopeptidases produz Ang III e Ang IV (84). Da mesma forma que a Ang II, mas com menor potência, a Ang III é também um fator de vasoconstrição e de aumento da PA, sem afetar a função renal (85). Por outro lado, a Ang IV parece ser um agente de proliferação celular, agindo através do receptor AT4R (Figura 4) e relacionado à consolidação da memória e aprendizado, fluxo sanguíneo e reabsorção tubular renal (76).

Menciona-se ainda, a Ang (1-9), um peptídeo intermediário com pouca atividade biológica conhecida até o momento que se presume estar envolvido na regulação da função plaquetária e melhora da ação da bradicinina (76). Também, o receptor (pró) renina que pode se ligar a renina bem como no seu precursor, a pró-renina, desempenha um papel no SRA tecido-específico, tal como no cérebro (86).

1.3.1 Bloqueadores do SRA utilizados no estudo

Historicamente, têm surgido diversas drogas eficazes para inibir praticamente todos os componentes ativos do SRA. Dentre os disponíveis comercialmente, pode-se citar: os inibidores da conversão de Ang I para Ang II; os bloqueadores da ativação seletiva do AT1R; e recentemente o inibidor direto da ação catalítica da renina. A eficácia destes fármacos é parcialmente baseada no fato de que eles não só inibem o SRA clássico circulante, mas também o SRA local nos tecidos (57).

1.3.1.1 Alisquireno

O hemifumarato de alisquireno é o primeiro de uma nova classe, com potente ação inibitória direta da atividade da renina plasmática, aprovado para comercialização em janeiro de 2008 (87). O alisquireno se liga ao sítio ativo da renina impedindo sua ação catalítica na conversão do angiotensinogênio em Ang I. Portanto, a inibição direta da primeira enzima limitante, a renina, provoca uma supressão geral do SRA, não só pela inibição da produção de Ang II, como também de todos os derivados do angiotensinogênio (88). O alisquireno apresenta eficiência comprovada na redução da PA em animais e pacientes hipertensos, e também foi relatado atenuar as lesões cardiovasculares e renais em vários modelos animais de doenças (87).

Sua biodisponibilidade é baixa (2% a 3%), mas apresenta grande afinidade pela renina. O pico plasmático ocorre uma a três horas após sua administração oral, sua meia-vida é de 24 a 36 horas, podendo ser administrado em dose única diária. Sua eliminação ocorre principalmente pelo trato hepato-biliar como droga não metabolizada. Em geral é bem tolerado, relatando-se como efeito adverso mais importante a diarreia, que é dose-dependente. Como algumas drogas que atuam no SRA, ele pode causar hiperpotassemia e piora da função renal em pacientes com doença renovascular. A dose recomendada para o tratamento da hipertensão arterial sistêmica é de 150 a 300 mg/dia (87-89).

Em janeiro de 2012, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou uma carta aos profissionais de saúde alertando sobre possíveis riscos do uso concomitante do alisquireno (Rasilez®; Novartis) com inibidores da ECA ou antagonistas do AT1R, em

pacientes com diabetes ou insuficiência renal. Logo após, a *Food Drug Administration* (FDA), agência reguladora dos EUA, ratificou o alerta. Isto se deve aos resultados preliminares do ensaio clínico ALTITUDE (*Aliskiren Trial in Type 2 Diabetes Using Cardio-Renal Endpoints*) sobre os riscos de comprometimento renal, um pequeno excesso de eventos cardiovasculares, hipotensão e hiperpotassemia (90).

1.3.1.2 Enalapril

Os inibidores da ECA desempenham papel relevante na terapia da HAS, na progressão de doenças cardiovasculares e renais, com benefícios na morbidade e na mortalidade cardiovascular (91). A introdução dessa família de anti-hipertensivos resultou, em grande parte, dos trabalhos experimentais pioneiros de pesquisadores brasileiros, Sérgio Ferreira e Maurício Rocha e Silva, com o veneno obtido da cobra *Bothrops jararaca* (62). A partir do reconhecimento do potencial terapêutico da inibição da ECA e de sua estrutura molecular foram desenvolvidos potentes e ativos inibidores por via oral. Essa classe de fármacos apresentou grande avanço desde que o primeiro composto, o captopril, foi liberado para uso clínico (92). Existem cerca de 20 inibidores da ECA utilizados na prática clínica nos últimos 30 anos.

O mecanismo de ação desta classe terapêutica de anti-hipertensivos se dá pela inibição da ECA que resulta, por um lado, na diminuição da catálise da Ang I em Ang II, e, por outro, no acúmulo de bradicinina, posto que a ECA é uma cininase II que atua tanto no SRA como no sistema caliceína-cinina. A preservação da bradicinina em conjunto com reduzida produção de Ang II pode explicar algumas das diferenças clínicas entre os inibidores da ECA e outros bloqueadores do SRA (93). Embora os inibidores da ECA diminuam a produção de Ang II, esta pode ser formada por vias alternativas não dependentes da ECA, mas em menores quantidades (91).

O maleato de enalapril é um pró-fármaco hidrolisado por esterases no fígado, produzindo sua forma ativa, o enalaprilato. É rapidamente absorvido, com pico de concentração plasmática cerca de três a quatro horas após sua ingestão. Em virtude de sua forte ligação à ECA tem meia-vida plasmática em torno de 11 horas, sendo excretado na forma de enalapril inalterado ou enalaprilato pelos rins. O enalapril apresenta eficácia no perfil de tolerabilidade e muitos dos efeitos observados, como cefaleia, tonteira e fadiga, não

diferem do placebo. Contudo, a tosse seca constitui o efeito adverso mais observado, sendo classe específica e atribuído ao acúmulo pulmonar de bradicinina, chegando algumas vezes a impedir seu uso continuado. O produto referência é produzido, sob o nome comercial de Renitec® pela Merk. A dose diária usual varia de 5 a 40 mg para todas as indicações, podendo ser administrado uma ou duas vezes ao dia (91, 94).

1.3.1.3 Losartana

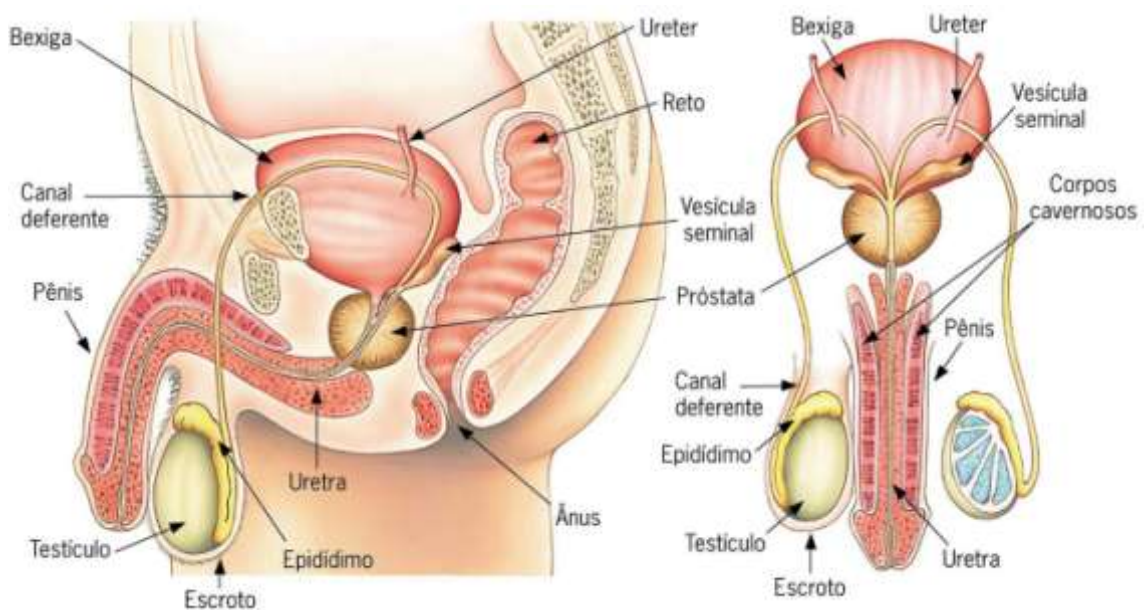
Os bloqueadores do receptor de Ang II formam uma classe de agentes para o tratamento da hipertensão e da insuficiência cardíaca, promovendo a inibição seletiva das ações da Ang II, especificamente no nível do AT1R, sem atuação nos demais subtipos de receptores. Por esta razão, bloqueiam todas as ações fisiologicamente relevantes da Ang II geradas pelo AT1R, independentemente da fonte ou via de síntese (91).

A losartana potássica foi o primeiro fármaco desta classe a ser disponibilizado no mercado, sendo inicialmente desenvolvido pela Merck, e comercializado sob o nome Cozaar®. Após administração oral é rapidamente absorvida, atingindo a máxima concentração após uma ou duas horas. Sofre metabolismo de primeira passagem, formando carboxílico ativo e outros metabólitos inativos. A biodisponibilidade sistêmica é de aproximadamente 33%, com concentrações plasmáticas atingidas de uma a quatro horas. Seu tempo de meia-vida é de aproximadamente seis horas e a excreção é renal e biliar. A dose usual varia de 25 a 100 mg, tomado uma vez ao dia para a maioria dos pacientes. Em geral é bem tolerada e seus efeitos colaterais têm sido de natureza leve e transitória, como tontura e hipotensão, não sendo requerida a descontinuação da terapia (94).

1.4 Sistema genital masculino

O sistema genital masculino de mamíferos é responsável pela produção contínua, nutrição e estocagem temporária dos espermatozóides, além de sua veiculação até as vias genitais femininas (95). Os órgãos desse sistema são os testículos, um sistema de ductos ou canais (incluindo epidídimos, ductos deferentes, ductos ejaculatórios e uretra), as glândulas sexuais acessórias (glândulas seminais, próstata e glândulas bulbouretrais) e estruturas de sustentação, incluindo o escroto e o pênis (96), como demonstrado na figura 2.

Figura 2 - Ilustração do sistema genital masculino



Nota: Visão geral do sistema genital masculino.
Fonte: (96).

Os testículos produzem os espermatozóides e secretam hormônios. O sistema de ductos transporta e armazena espermatozóides, auxilia na sua manutenção e os transporta ao meio externo. O sêmen contém espermatozóides mais as secreções fornecidas pelas glândulas sexuais acessórias. As estruturas de sustentação possuem várias funções: o pênis transporta os espermatozóides para o trato genital feminino, além de ser o órgão da cópula masculino e o escroto aloja os testículos (96).

1.4.1 Testículos

Corresponde à gônada masculina, com função exócrina e endócrina, produzindo tanto os espermatozoides quanto hormônios, dentre eles, os andrógenos que servem para manter a função reprodutiva e as características sexuais secundárias (97, 98) e também produz estrógenos a partir da aromatização de andrógenos (99, 100).

O testículo é envolto por uma espessa cápsula de tecido conjuntivo denso, denominada túnica albugínea, da qual partem septos fibrosos para o interior do parênquima testicular, dividindo o órgão em lóbulos. Morfologicamente, o parênquima testicular constitui-se do compartimento dos túbulos seminíferos e o compartimento intertubular ou intersticial (97, 101).

O compartimento dos túbulos seminíferos não é innervado nem vascularizado e constitui a maior parte do órgão na maioria das espécies. Cada túbulo seminífero é constituído pela túnica própria e epitélio seminífero, delimitando o lúmen tubular (97, 101). A túnica própria possui uma ou mais camadas de células mióides contráteis, dependendo da espécie, e material intercelular, incluindo fibras colágenas e elásticas, além de outros componentes da matriz extracelular (102-104). O epitélio seminífero é constituído por camadas concêntricas de células germinativas associadas a um único tipo de célula somática, a célula de Sertoli (105). As células germinativas se desenvolvem em estreita interação com as células de Sertoli que desempenham um importante papel na regulação da espermatogênese (106, 107).

As células de Sertoli exercem funções especializadas, a maioria das quais estão relacionadas à manutenção, proliferação e diferenciação das células germinativas. Dentre essas funções destaca-se o suporte e nutrição das células, liberação de espermátides maduras para o lúmen do túbulo seminífero, secreção do fluido testicular e de proteínas, como a proteína de ligação a andrógenos e inibina, dentre outras, além de fagocitose das células germinativas em degeneração e corpos residuais, resultantes da espermiogênese (108). Destaca-se ainda a compartimentalização do túbulo seminífero estabelecida por junções de oclusão que unem as células de Sertoli entre si, formando a barreira de célula de Sertoli, que proporciona um ambiente protegido e especializado para as células germinativas (105). A célula de Sertoli é ainda uma célula chave que medeia as ações dos hormônios folículo estimulante (FSH) e da testosterona (108).

No compartimento intertubular são encontradas as células de Leydig, associadas a vasos sanguíneos e linfáticos, que são essenciais para o transporte de hormônios e nutrientes

no testículo, além de fibras e células de tecido conjuntivo, especialmente macrófagos e ocasionalmente mastócitos (108). A célula de Leydig possui abundante retículo endoplasmático liso e mitocôndrias com cristas tubulares, os quais contêm as enzimas associadas à síntese de esteróides (97), como a 3β -hidroxiesteróide desidrogenase, responsável por várias etapas na via esteroidogênica, incluindo a síntese de androstenediona, precursora da testosterona (109).

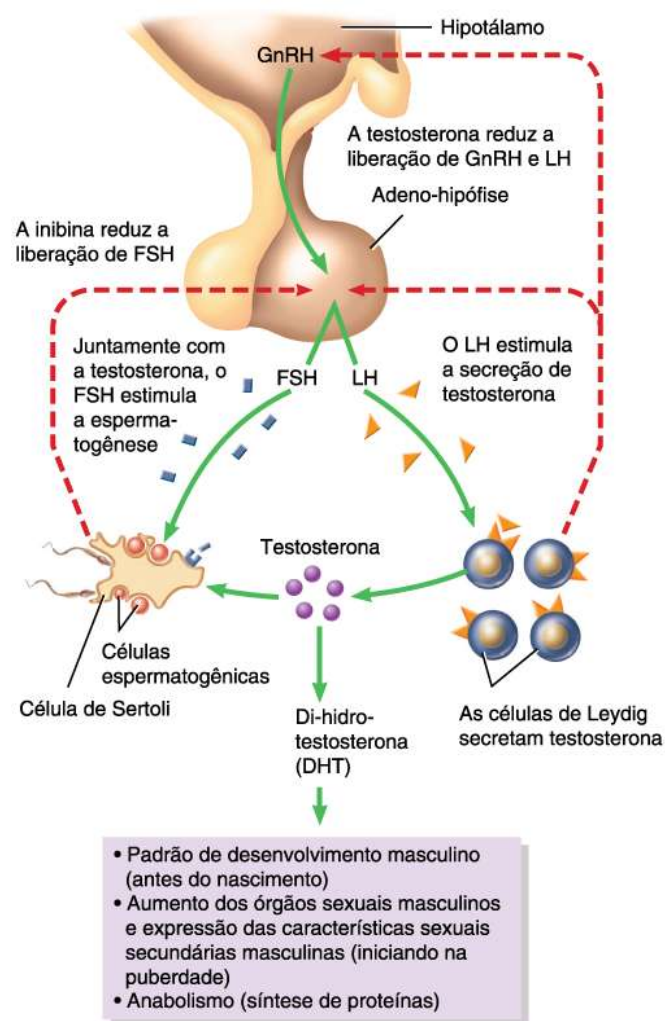
A testosterona produzida pelas células de Leydig é fundamental durante o desenvolvimento fetal, para a diferenciação sexual masculina, e pós-natal, para a iniciação e manutenção da espermatogênese, além da expressão de características sexuais masculinas secundárias (110, 111).

1.4.1.1 Espermatogênese

O processo de espermatogênese nos mamíferos é composto de três fases distintas, baseado em características morfológicas e funcionais: a) fase proliferativa ou espermatogonial, na qual as espermatogônias passam por uma série de divisões mitóticas; b) fase meiótica ou espermatocitária, na qual as espermatogônias já comprometidas com a diferenciação formam os espermatócitos primários que iniciam a primeira divisão meiótica, formando os espermatócitos secundários, que em seguida sofrem a segunda divisão meiótica, formando as espermatídes arredondadas; e c) fase de diferenciação ou espermiogênica, onde as espermatídes arredondadas sofrem modificações morfológicas originando células especializadas para a fertilização, os espermatozóides (97).

A iniciação e manutenção da espermatogênese requerem a secreção de gonadotrofinas, hormônio luteinizante (LH) e FSH, a partir da hipófise, em resposta ao hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), o qual é produzido por neurônios do hipotálamo (Figura 3). O GnRH tem sua liberação controlada por kisspeptinas, peptídeos que atuam como ligantes naturais para o receptor MAS, órfão acoplado a proteína-G (112, 113). As kisspeptinas atuam por *feedback* positivo e negativo do eixo hipotálamo hipófisário-gonadal (114-116). Através de *feedback* positivo estimulam a secreção de LH (114), e ainda medeiam por *feedback* negativo de testosterona sobre a secreção de GnRH (116).

Figura 3 - Controle hormonal da espermatogênese e ações da testosterona e di-hidrotestosterona



Nota: As linhas vermelhas tracejadas indicam a inibição por retroalimentação negativa.
Fonte: (96).

As células de Leydig estimuladas pelo LH sintetizam a testosterona, considerado o principal hormônio para o controle da espermatogênese, sendo essencial para a iniciação e manutenção desse processo, além de exercer efeito *feedback* negativo na liberação de LH e GnRH (97).

As células de Sertoli possuem receptores para o FSH e testosterona, que são os principais reguladores hormonais da espermatogênese. Estimuladas pelo FSH, essas células secretam glicoproteínas que são essenciais para o sucesso da espermatogênese, tal como a proteína de ligação a andrógenos, que é responsável pelo transporte e proteção de andrógenos contra a degradação, facilitando sua concentração nos testículos e sua veiculação pelas vias genitais masculinas (117). Produzem ainda inibina e ativina, sendo que a ativina estimula a

produção de FSH, enquanto a inibina exerce efeito po *feedback* negativo na liberação de FSH (118, 119).

A ação de *feedback* negativo dos andrógenos sobre a secreção de gonadotrofinas pode ocorrer de forma direta, mediada pelos receptores de andrógenos, ou indireta, mediada pela aromatização de andrógenos à estrógenos. As ações fisiológicas dos estrógenos são mediadas por proteínas intracelulares específicas, denominadas receptores de estrógenos (ER), com dois subtipos: receptor de estrógeno alfa (ER- α) e receptor de estrógeno beta (ER- β), os quais são predominantemente nucleares (120). No testículo, ER- β é o receptor mais abundante sendo encontrado nas células peritubulares mióides, nas células intersticiais de Leydig, células de Sertoli e em células germinativas com exceção de espermátides alongadas, mas principalmente em espermatócitos (121). Em contrapartida ER- α é encontrado somente em células de Leydig e algumas células peritubulares mióides (120, 122).

A atividade de estrógenos na espermatogênese envolve a indução da proliferação de células germinativas, diferenciação e maturação final de espermátides, bem como a regulação da sobrevivência e inibição de apoptose das células germinativas. As etapas finais da maturação de espermátides são particularmente sensíveis e dependentes de estrógenos (120).

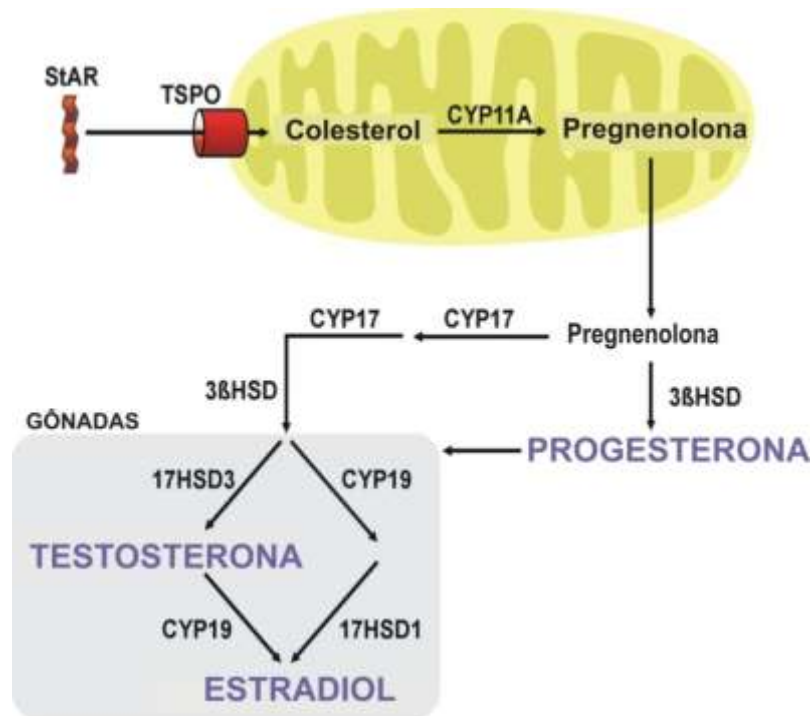
1.4.1.2 Esteroidogênese

Hormônios esteróides são compostos derivados do colesterol e sintetizados nas glândulas suprarrenais, gônadas, tecido adiposo e no sistema nervoso central. Diferentes hormônios esteróides possuem efeitos fisiológicos distintos, sendo que o tipo de hormônio produzido depende do arranjo de enzimas esteroidogênicas presentes no tecido em questão (123).

A biossíntese de esteróides ocorre em duas etapas: a) transporte de colesterol para as mitocôndrias e formação de pregnenolona; b) metabolismo de pregnenolona por enzimas esteroidogênicas em tecidos específicos. Na primeira etapa, o transporte do colesterol do citoplasma para o interior da mitocôndria é realizado pela proteína StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*) juntamente com a proteína translocadora TSPO (*translocator protein*), uma proteína de alta afinidade por colesterol que se encontra localizada na membrana mitocondrial externa (Figura 4). Uma vez na matriz mitocondrial, o colesterol é clivado em pregnenolona, pela enzima CYP11A ou enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol

(*P450_{scc}* – *side chain cleavage*), presente na membrana mitocondrial interna (124). A pregnenolona livre difunde para fora da mitocôndria e a partir de então será usada para a formação dos hormônios esteróides (glicocorticoides, mineralocorticoides, andrógenos, estrógenos, progestógenos).

Figura 4 - Via biossintética de esteróides nos testículos



Nota: Adaptado de Martinez-Arguelles e Papadopoulos, 2010.
Fonte: (124).

Nos testículos, a esteroidogênese é composta basicamente da produção de andrógenos pelas células de Leydig. O andrógeno mais importante sintetizado nos testículos é a testosterona, que é requerida para produção espermática e manutenção da função sexual masculina (125). Para sua produção existe a participação de uma cascata de enzimas, como a CYP17 (P450c17 ou 17 α -hidroxilase/C17-20 liase), enzima que prossegue a biossíntese de testosterona, induzindo a conversão de progesterona a 17 α -hidroxiprogesterona, e em seguida a androstenediona. Finalmente, a androstenediona é convertida, através da ação da enzima 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase (17 β -HSD), em testosterona (123).

A testosterona produzida nos testículos pode ser metabolizada pela enzima 5 α -redutase em DHT, um andrógeno metabolicamente mais ativo que a testosterona (125), ou pode ainda ser aromatizada a 17 β -estradiol pela ação da enzima P450 aromatase (99).

1.4.1.3 SRA nos testículos

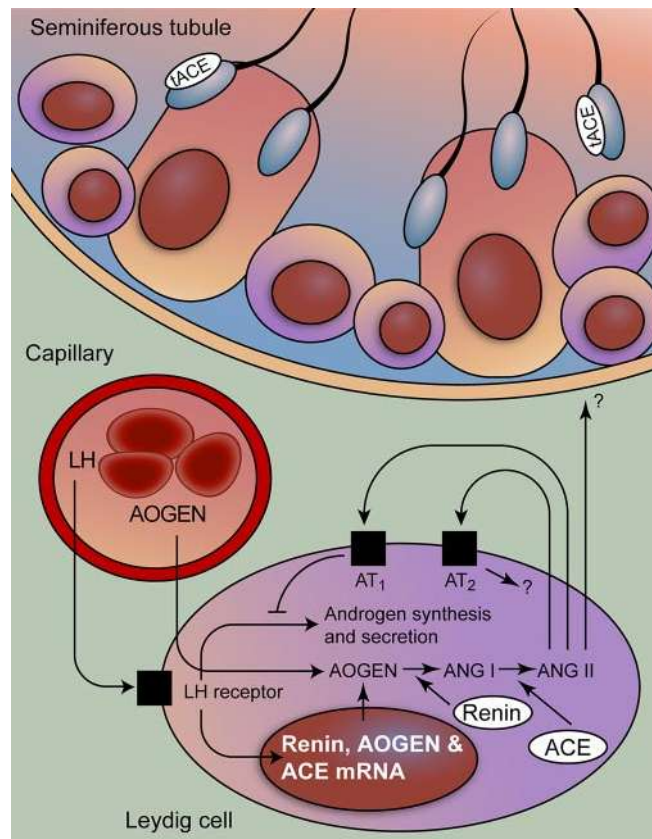
No sistema reprodutor masculino, a função local do SRA é sabidamente relevante para a fertilidade. Este sistema é regulado de forma independente do SRA plasmático e apresenta tanto a ECA somática quanto a ECA testicular (ECA_t) (18). Outros componentes do sistema SRA já foram identificados no testículo, como o angiotensinogênio e a renina, porém suas funções não estão totalmente escalrecidas (15), como ilustrado na figura 5.

O mRNA do angiotensinogênio foi detectado em tecido testicular em algumas espécies (18). *Dzau et al.* (126) mostrou o mRNA do angiotensinogênio no testículo de camundongos, enquanto que no testículo de ratos era indetectável. Isto corrobora os achados de *Campbell e Habener* (127) que não podiam detectar o mRNA do angiotensinogênio em testículo de ratos usando transferência de northern blotting. Apenas quando se utilizava a técnica de hibridação com o aumento da sensibilidade, pequenas quantidades de mRNA do angiotensinogênio poderia ser detectado em testículos de ratos (128).

A presença da renina e do seu mRNA foram relatadas nas células de Leydig dos testículos de ratos e camundongos. A renina é um peptídeo que inicia sua atividade na puberdade e mostra ter uma correlação direta com os níveis plasmáticos de gonadotrofinas(129).

A ECA germinal ou ECA testicular (ECA_t), expressa somente em testículos, origina-se do promotor localizado dentro do intron 12 e produz uma proteína com somente um domínio e sítio catalítico. Sua expressão é importante para fertilidade masculina normal, é uma isoforma de aproximadamente 90 kDa, encontrada ancorada à membrana plasmática exclusivamente de espermátides e espermatozóides em desenvolvimento e nos diferenciados, sendo portanto testículo-específica (130). A forma testicular da enzima é menor do que a ECA somática (732 versus 1306 resíduos) e contém somente o C-domínio, o qual é ancorado nas membranas celulares (131, 132). Os 67 aminoácidos da ECA_t humana não estão presentes na enzima somática, entretanto, os últimos 665 resíduos são idênticos com a porção C-terminal da ECA somática; dessa maneira existe a falta do sítio ativo do N-domínio. A isoforma testicular da ECA, bem como a enzima somática, apresentam atividades enzimáticas semelhantes, diferindo apenas no tamanho e nas propriedades imunológicas (133).

Figura 5 - SRA nos testículos.



Legenda: Localização de ANG II formando vias através das células de Leydig.

Nota: A expressão da isoforma testicular da ECA (ECA_t) em células germinativas

Fonte: (18).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar os efeitos pleiotrópicos dos bloqueadores do SRA no testículo de camundongos da linhagem C57BL/6 alimentados com uma dieta de alta densidade energética.

2.2 Específicos

- a. Analisar os efeitos pleiotrópicos dos fármacos que bloqueiam em diferentes níveis o SRA, o perfil lipídico de colesterol e triglicerídeos;
- b. Analisar os efeitos pleiotrópicos dos fármacos que bloqueiam em diferentes níveis o SRA, através da análise da expressão proteica e gênica (Aromatase, LH-r e StAR) na esteroidogênese testicular;
- c. Analisar as vias de sinalização do SRA (Enzima conversora da angiotensina 1, Receptores da angiotensina II tipo 1 e Renina) no testículo;
- d. Analisar os efeitos dos fármacos que bloqueiam em diferentes níveis o SRA sobre os parâmetros morfológico-quantitativos e estruturais do testículo;
- e. Comparar os resultados com três bloqueadores farmacológicos do SRA diferentes: inibidor da renina (alisquireno), inibidor da enzima conversora da angiotensina (enalapril) e bloqueador do receptor tipo 1 da angiotensina II (AT1R) (losartana);

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Comitê de ética

O trabalho foi realizado no Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doença Cardiovascular, sendo aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), sob o número de protocolo CEUA/010/2013 conforme o anexo A.

3.2 Modelo experimental

Foram utilizados camundongos C57BL/6 com 12 semanas de idade, provenientes do biotério central da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Os animais foram mantidos em ciclo invertido claro/escuro (12h / 12h), umidade ($60 \pm 10\%$) e temperatura ambiente ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$) controladas e ciclo de exaustão de ar (15 minutos/hora). Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos nutricionais e alimentados durante oito semanas da seguinte forma:

- a) Dieta controle (*standard chow* - **SC**, n = 15), energia total de 15 kJ/g;
- b) Dieta de alta densidade energética (*high energy density* - **HED**, n = 60), energia total de 21 kJ/g.

Os animais tiveram livre acesso à comida e água, ambas repostas diariamente. As dietas foram próprias para roedores, seguindo as recomendações da AIN-93 M (134) para fase de manutenção. Ambas as dietas experimentais foram elaboradas com nutrientes purificados pela PragSoluções (Jaú, São Paulo, Brasil, www.pragsolucoes.com.br) e a composição está demonstrada na tabela 1.

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais. De acordo com recomendações da AIN-93M (134).

Ingredientes	Dieta (g/kg)	
	SC	HED
Caseína (> 85% proteína)	140	175
Amido de milho	466	193
Amido dextrinizado	155	155
Sacarose	100	100
Óleo de soja	40	40
Banha de porco	-	238
Fibra	50	50
Mix Vitaminas	10	10
Mix Minerais	35	35
Cisteína	1,8	1,8
Colina	2,5	2,5
Antioxidante	0,008	0,008
Energia (kJ/g)	15	21
Carboidrato (%)	76	36
Proteína (%)	14	14
Gordura (%)	10	50

Fonte: O autor, 2015.

As doses dos fármacos administrados aos diferentes grupos experimentais foram baseadas em dois pressupostos: a) as doses foram testadas em estudos prévios com roedores [alisquireno (89), enalapril (135) e losartana (136)] apresentando resultados esperados; b) foi considerada a possibilidade de um estudo translacional, em que a equivalência de doses em humanos está descrita de acordo com a correspondência entre as espécies (137). Após o período de oito semanas, os camundongos alimentados com a dieta HED foram subdivididos aleatoriamente em quatro grupos (n = 15 em cada grupo). O grupo SC continuou sem tratamento até o final do experimento, portanto, perfazendo os cinco grupos que seguem:

- a) **SC:** camundongos alimentados com dieta controle;
- b) **HED:** camundongos não tratados alimentados com dieta de alta densidade energética;

- c) **HED-A:** camundongos HED tratados com alisquireno (50 mg/kg/dia), Rasilez®, Novartis;
- d) **HED-E:** camundongos HED tratados com maleato de enalapril (30 mg/kg/dia), Renitec®, Merck;
- e) **HED-L:** camundongos HED tratados com losartana potássica (10 mg/kg/dia), Cozaar®, Merck.

Os tratamentos tiveram duração de seis semanas e os fármacos foram adicionados à dieta nas quantidades descritas acima, todos os grupos continuaram com livre acesso às dietas e/ou tratamentos durante todo o período experimental.

Os animais foram mortos por sobre dose anestésica com tiopental via intraperitoneal (30 mg/kg peso corporal). As amostras de sangue foram retiradas por punção cardíaca do átrio direito, processadas e o soro armazenado a -20°C para posterior dosagem dos hormônios por técnica específica e avaliação do perfil lipídico, os testículos direito foram imediatamente armazenados em nitrogênio líquido para posterior análise por PCR em tempo real e *western blott*, os testículos esquerdos eram excisados e o seu volume analisado em gramas pelo método de Scherle (138). Sendo então, fixados em formalina tamponada 10%, processado e incluído em paraplast, cortados na espessura de 5 µm e corados com a técnica histoquímica de hematoxilina & eosina para posterior análise morfométrica e estereológica.

3.3 Pressão arterial sistólica (PAS)

Os animais foram adaptados durante duas semanas para minimizar o estresse. Posteriormente, a PA sistólica foi mensurada semanalmente, através do método não invasivo de pletismografia da artéria caudal (Letica LE 5100; Panlab, Barcelona, Espanha). A média de três aferições em cada momento foi utilizada.

3.4 Análise sérica

O perfil lipídico foi avaliado com a utilização de kit específico para colesterol (K083) e triglicerídeos (K117) da Bioclin™. As concentrações séricas de testosterona (049094-6) e

estradiol (049015-6) foram mensuradas por quimiluminescência (Hoffman La Roche, Basel, Suíça), sendo o limite de detecção para testosterona de 0,025 ng/ml e para estradiol de 5,0 pg/ml. A concentração de LH (E90441Mu, USCNK[®]) foi determinada por ensaio imunoenzimático com limite de detecção de 142,5 pg/ml.

3.5 PCR em tempo real

O RNA total foi extraído usando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acordo com o protocolo do fabricante (139). Resumidamente, os testículos foram homogeneizados em 1 mL de reagente Trizol. Em seguida, o RNA foi extraído com fenol/clorofórmio e a solução precipitada por álcool isopropílico. Após a lavagem com etanol a 75%, o RNA foi seco e dissolvido com água deionizada (MilliQ). A qualidade das amostras de RNA foi verificada pela determinação da relação de 260 nm / 280 nm e armazenadas a -80°C até o momento de sua utilização. As reações foram feitas em triplicata e normalizadas pela expressão dos genes da β -actina e do *Tata Box Protein* (TBP) e as sequências dos *primers* utilizados são descritas na tabela 2.

Tabela 2 - Sequência dos *primers* utilizados para as amplificações na técnica de PCR em tempo real.

Gene	Sequência
β actin	5' - tgttaccactgggacgaca - 3' 5' - ggggtgttgaaggctcaaa - 3'
Aromatase	5' - ctttcagccttttgctttg - 3' 5' - caagtgccctgtcctcattt - 3'
Luteinizing Hormone Receptor (LH-r)	5' - gtggcacaccatcacctatg - 3' 5' - ggaggcagatgctgactttc - 3'
Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR)	5' - agatgtgggcaaggtgttc - 3' 5' - tgatgaccgtgtctttcca - 3'
Tata Box Protein (TBP)	5' - cagcctccacctatgctc - 3' 5' - ttgctgctgctgtctttgtt - 3'

Fonte: O autor, 2015.

3.6 Western Blott

Os testículos foram homogeneizados com o tampão de extração RIPA (radioimunoprecipitação) suplementado com inibidores de protease sendo centrifugado (14.000g durante 60 minutos a 4°C) e o sobrenadante recolhido.

A concentração total de proteínas foi determinada utilizando um kit de ensaio de proteínas BCA (ThermoScientific, Rockford, IL, EUA). Após desnaturação (5 minutos a 100°C), quantidades iguais de proteínas (~ 30 - 60 µg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (8 - 10% SDS-PAGE) e transferidos para uma membrana de nitrocelulose (AmershamBiosciences, Piscataway, NJ, USA). A membrana foi então bloqueada por incubação em 5% de BSA, ambos diluídos em tampão salina com Tris (TBS-T [20 mmol/L de Tris/HCl (pH 7,4) e 500 mmol/L de NaCl] em temperatura ambiente, durante duas horas para evitar ligações inespecíficas. Sequencialmente, a membrana foi incubada por duas horas em temperatura ambiente e posteriormente *overnight* a 4°C com os anticorpos primários descritos na tabela 3.

Tabela 3 - Anticorpos utilizados na técnica de western blott.

Anticorpoprímario	Fator de diluição	Fabricante
Anti-Aromatase; (ab69653)	1:500	Abcam (USA)
Luteinizing Hormone Receptor, LHR antibody (H50); (sc25828)	1:200	Santa Cruz Biotechnology (USA)
Steroidogenic Acute Regulatory Protein, Anti-StAR; (ab58013)	1:1000	Abcam (USA)
Anti-Angiotensin Converting Enzyme; (ab11734)	1:500	Abcam (USA)
Angiotensin IIreceptortype 1, AT1R (306); sc579	1:1000	Santa Cruz Biotechnology (USA)
ReninAntibody (A-1); sc137252	1:1000	Santa Cruz Biotechnology (USA)

Nota: As letras e os números entre parênteses correspondem ao número de catálogo do anticorpo
Fonte: O autor, 2015.

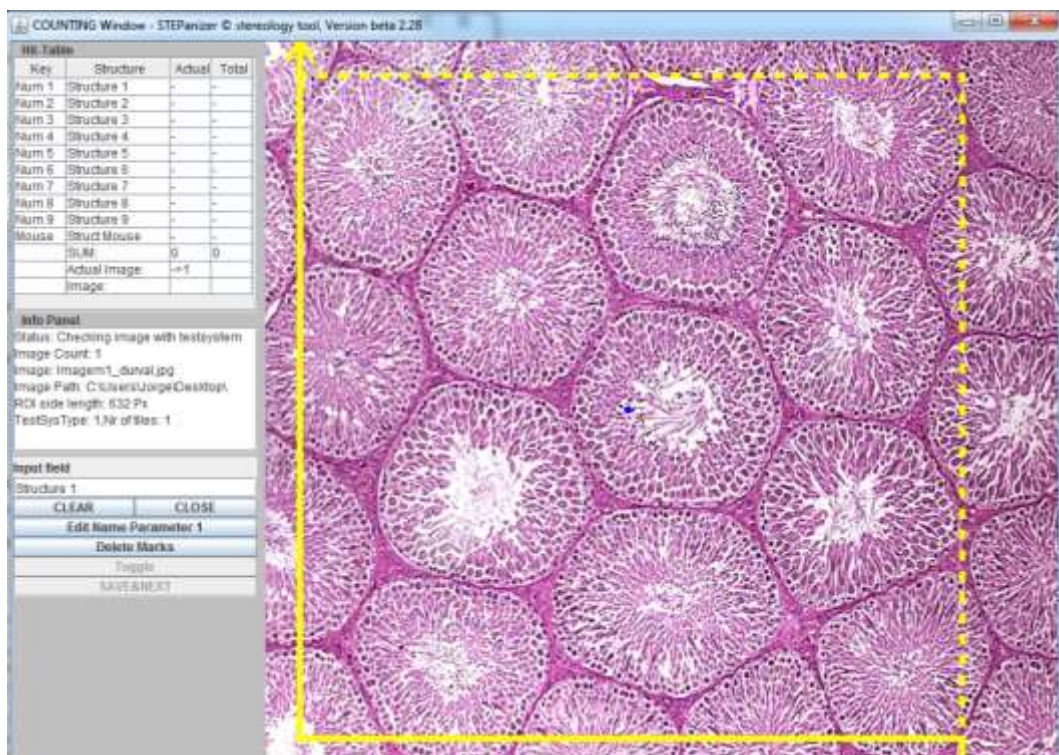
Após o anticorpo primário, as membranas eram incubadas com o anticorpo secundário específico para a origem do anticorpo primário, durante uma hora à temperatura ambiente. A expressão das proteínas foi detectada por meio de um sistema de detecção de quimiluminescência com ECL e as imagens das bandas foram obtidas com o sistema ChemiDoc XRS de imagens moleculares (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A intensidade das bandas quimioluminescentes foi quantificada utilizando o *software* Image_J, versão 1.44 (NIH, imagej.nih.gov/ij, USA).

O complexo de ligação do anticorpo foi retirado e a membrana foi remarcada com beta-actina (anti-camundongo, SC81178, Santa Cruz Biotechnology, USA - 1:1000), como proteína constitutiva para normalizar os dados obtidos pelo *western blott*. Os níveis de proteína nos grupos HED com ou sem tratamento foram expressos como uma percentagem do nível de proteínas do grupo SC.

3.7 Estereologia do testículo

A densidade por área (Q_a) dos túbulos seminíferos foi avaliada tendo em consideração o número de túbulos seminíferos em um quadro de área conhecida sendo contados aqueles que dentro dessa área não atingiam as linhas proibidas ou suas extensões, baseado na web STEPanizer (www.stepanizer.com) (140). A densidade de comprimento (L_v túbulos, testículo) dos túbulos seminíferos foi realizada como descrito anteriormente por Mandarin-de-Lacerda *et. al*, assim como o comprimento total (L) dos túbulos (141).

Figura 6 - Técnica estereológica para quantificação da densidade por área (Q_a) dos túbulos seminíferos

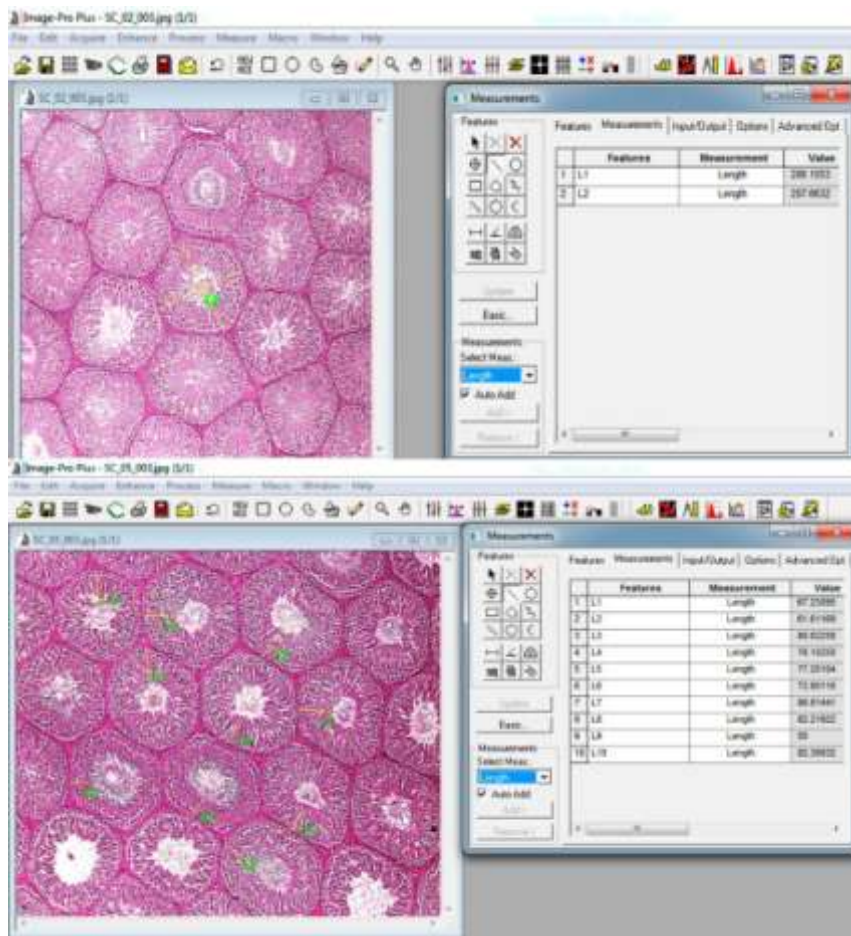


Fonte: O autor, 2015.

3.8 Morfometria do testículo

O diâmetro médio dos túbulos foi estimado através da aferição do menor e maior diâmetro com a utilização do *software* Image-Pro Plus (versão 7.01, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Foram utilizados 5 animais por grupo, em cada animal 10 campos distintos e aleatórios foram selecionados, cada campo foi realizado a medida de 5 túbulos, totalizando 250 medidas por grupo. As medições foram realizadas independentemente da fase do ciclo do epitélio seminífero, os cortes foram escolhidos aleatoriamente por varredura horizontal e, todas as medidas foram realizadas em um microscópio óptico com uma objectiva de 10x. A altura do epitélio testicular foi medida pela distância entre o pólo basal e o pólo apical dos túbulos. Dez medições lineares foram realizadas em 5 campos diferentes distribuídos aleatoriamente ao longo dos túbulos em um total de 250 medições por grupo, expresso em μm (141).

Figura 7 - Técnica morfométrica para mensuração do diâmetro dos túbulos seminíferos e altura do epitélio



Fonte: O autor, 2015.

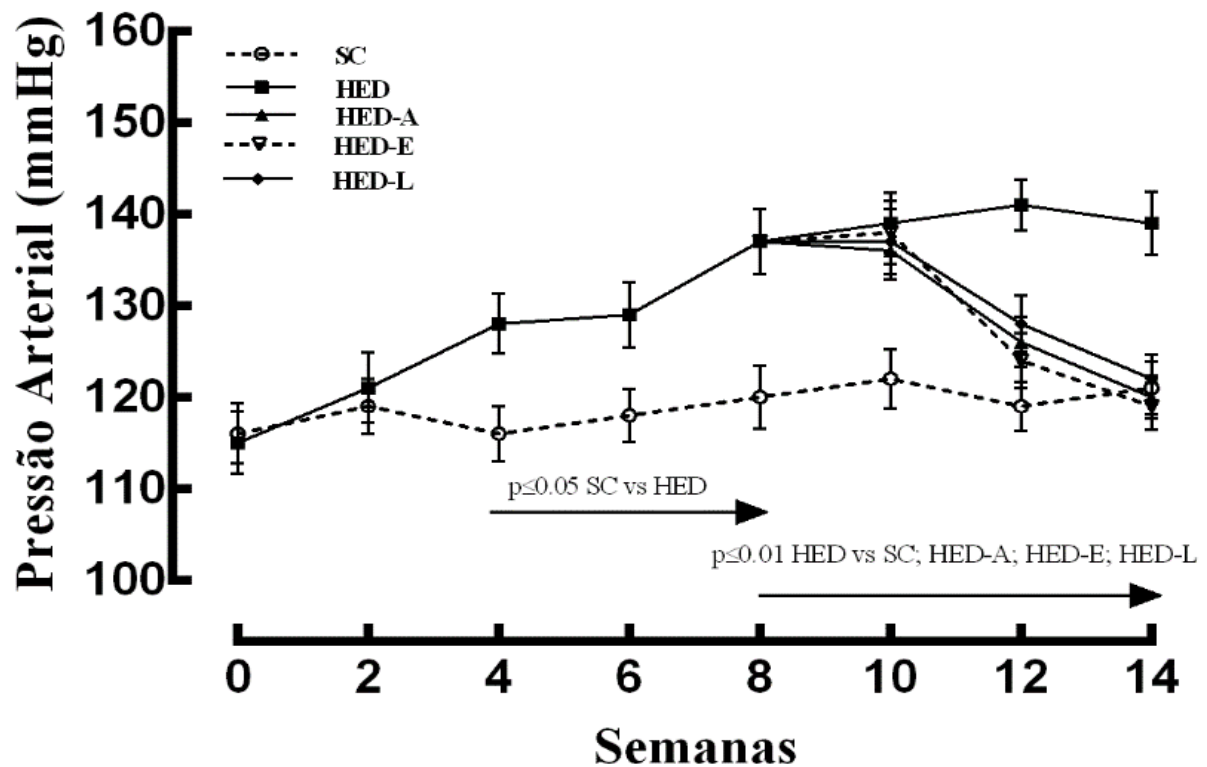
3.9 Análise estatística

Todos os dados foram testados quanto à normalidade e homocedasticidade das variâncias. Os dados são mostrados como média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram testadas pela análise de variância *one-way* (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Holm-Sidak. Em todos os casos, o nível de significância adotado foi de $P \leq 0,05$, realizado pelo programa *GraphPad Prism* (versão 6.02 para Windows, *GraphPad Software*, La Jolla, CA, USA), o qual também foi utilizado para confecção dos gráficos.

4 RESULTADOS

Após quatro semanas de consumo da dieta HED ocorreu uma elevação na PAS nos animais desse grupo em comparação aos animais do grupo SC (10%, $P < 0,05$). Esta diferença continuou aumentando até atingir um nível 15% maior nos animais HED em relação aos seus controles (Figura 8), ao completar as 14 semanas do período experimental ($P < 0,01$). Ao final do experimento, todos os tratamentos foram eficientes em diminuir a PAS para níveis semelhantes aos do grupo SC.

Figura 8 - Pressão arterial sistólica.



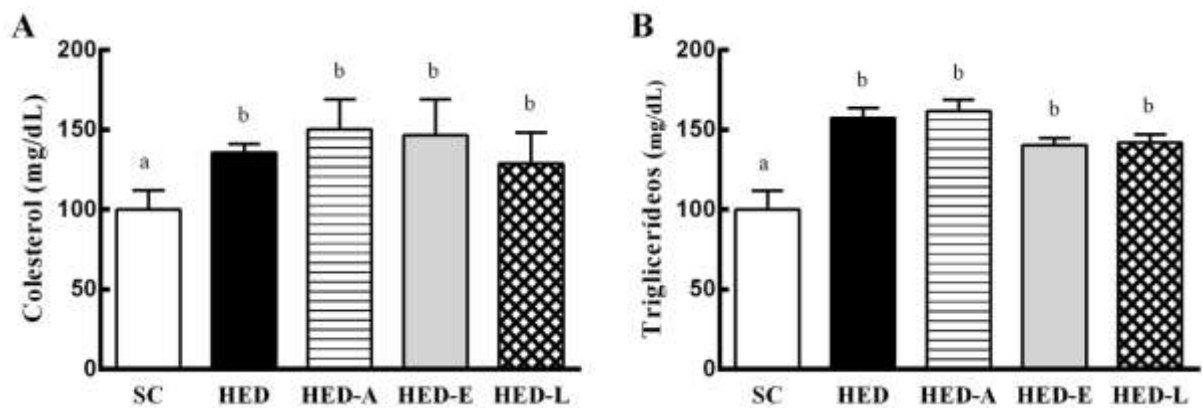
Legenda: Pressão arterial sistólica de camundongos alimentados com dieta padrão (SC) ou uma dieta de alta densidade energética (HED).

Nota: O grupo HED foi tratado com alisquireno (HED-A: 50 mg/kg/dia), maleato de enalapril (HED-E: 30 mg/kg/dia), losartana (HED-L: 10 mg/kg/dia) ou nenhuma droga (HED). Os valores são apresentados como média \pm EPM para 10 animais por grupo.

Fonte: O autor, 2015.

Em relação ao perfil lipídico, os grupos HED (41,13%, $P = 0,0062$), HED-A (50,18%, $P < 0,0001$), HED-E (46,56%, $P = 0,0002$) e HED-L (28,95%, $P = 0,0249$) apresentaram níveis elevados de colesterol e de triglicerídeos HED (57,56%, $P < 0,0001$), HED-A (61,76%, $P < 0,0001$), HED-E (40,34%, $P = 0,0040$) e HED-L (42,02%, $P = 0,0029$) quando comparados ao grupo SC. Estes resultados são apresentados na figura 9.

Figura 9 - Perfil lipídico de colesterol e triglicerídeos



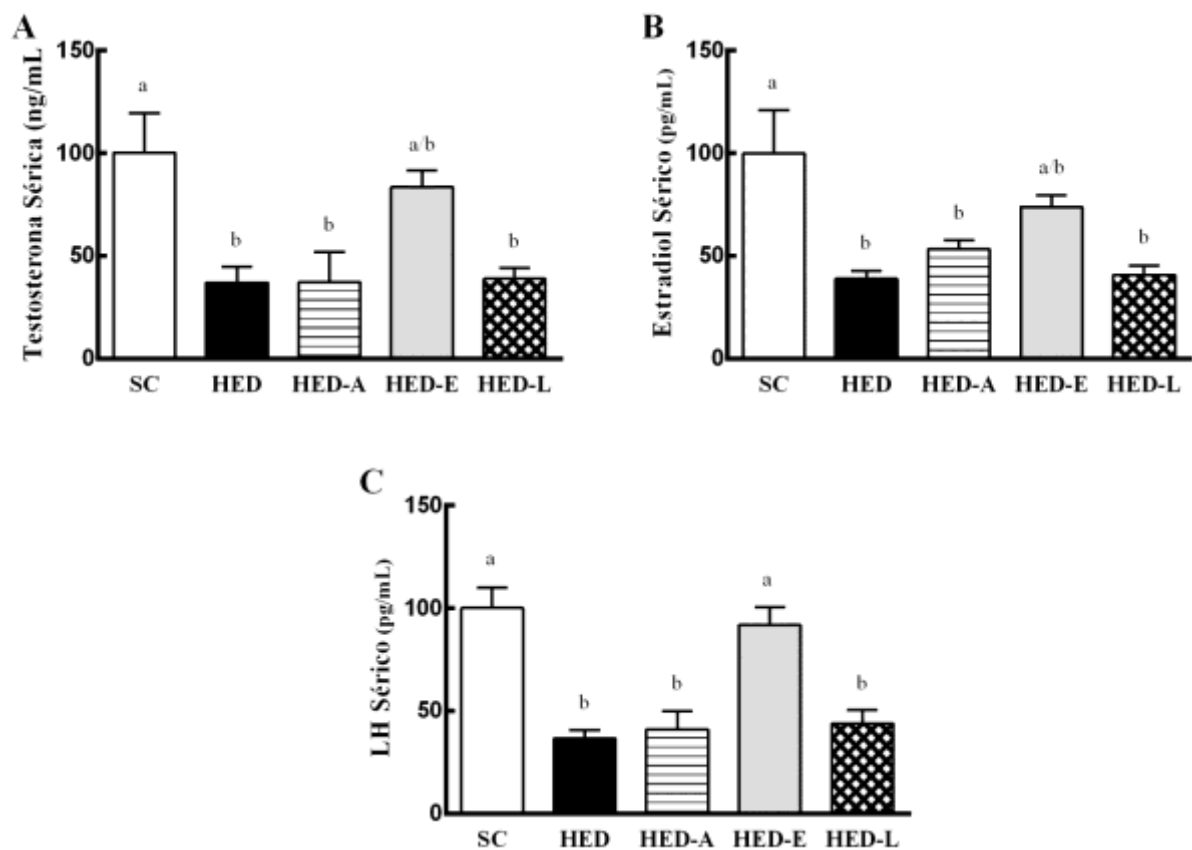
Legenda: Perfil lipídico de colesterol (A) e triglicerídeos (B) de camundongos alimentados com dieta padrão (SC) ou uma dieta de alta densidade energética (HED)

Nota: O grupo HED foi tratado com alisquireno (HED-A: 50 mg/kg/dia), maleato de enalapril (HED-E: 30 mg/kg/dia), losartana (HED-L: 10 mg/kg/dia) ou nenhuma droga (HED). Os valores são apresentados como média \pm EPM para 10 animais por grupo. Letras diferentes indicam significância estatística.

Fonte: O autor, 2015.

Os níveis séricos dos de testosterona, estradiol e LH, apresentaram redução significativa em relação aos animais do grupo SC, os níveis de testosterona dos grupos HED (63,04%, $P = 0,0151$), HED-A (62,83%, $P = 0,0151$) e HED-L (61,13%, $P = 0,0157$), de estradiol dos grupos HED (61,2%, $P = 0,0042$), HED-A (46,7%, $P = 0,0336$) e HED-L (59,25%, $P = 0,0051$) e de LH dos grupos HED (63,46%, $P < 0,0001$), HED-A (58,95%, $P = 0,0002$) e HED-L (56,14%, $P = 0,0003$). Estes resultados são apresentados na figura 10.

Figura 10 - Testosterona sérica, estradiol sérico e LH



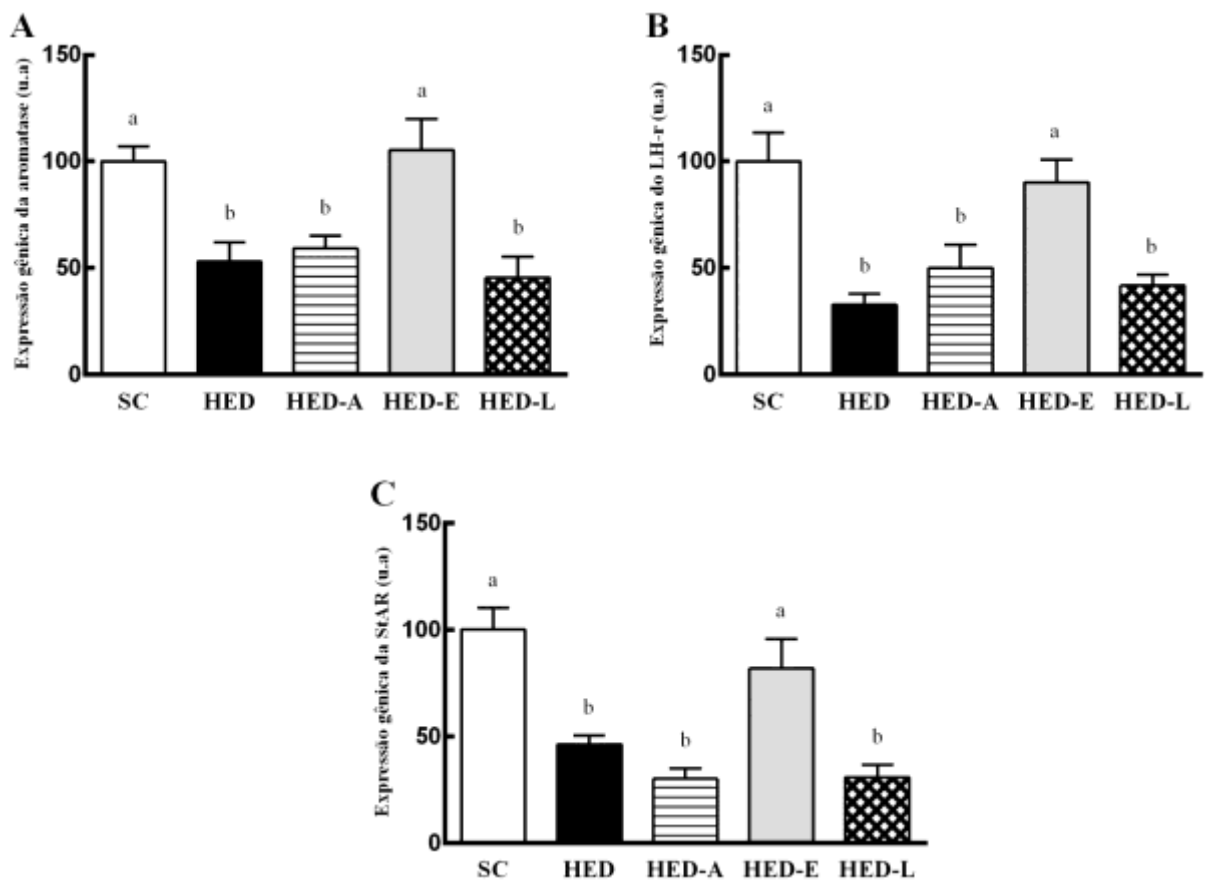
Legenda: Testosterona sérica (A), estradiol sérico (B) e LH sérico (C) de camundongos alimentados com dieta padrão (SC) ou uma dieta de alta densidade energética (HED)

Nota: O grupo HED foi tratado com alisquireno (HED-A: 50 mg/kg/dia), maleato de enalapril (HED-E: 30 mg/kg/dia), losartana (HED-L: 10 mg/kg/dia) ou nenhuma droga (HED). Os valores são apresentados como média \pm EPM para 10 animais por grupo. Letras diferentes indicam significância estatística.

Fonte: O autor, 2015.

A expressão gênica apresentou redução significativa em relação aos animais do grupo SC, da enzima aromatase dos grupos HED (47,33%, $P = 0,0202$), HED-A (40,41%, $P = 0,0393$) e HED-L (56,97%, $P = 0,0073$), do LH-r dos grupos HED (67,14%, $P = 0,0008$), HED-A (50,05%, $P = 0,0109$) e HED-L (58,22%, $P = 0,0035$) e da StAR dos grupos HED (55,12%, $P = 0,0022$), HED-A (69,99%, $P = 0,0001$) e HED-L (69,14%, $P = 0,0001$). Estes resultados são apresentados na figura 11.

Figura 11 - Expressão gênica da aromatase, LH-r e StAR



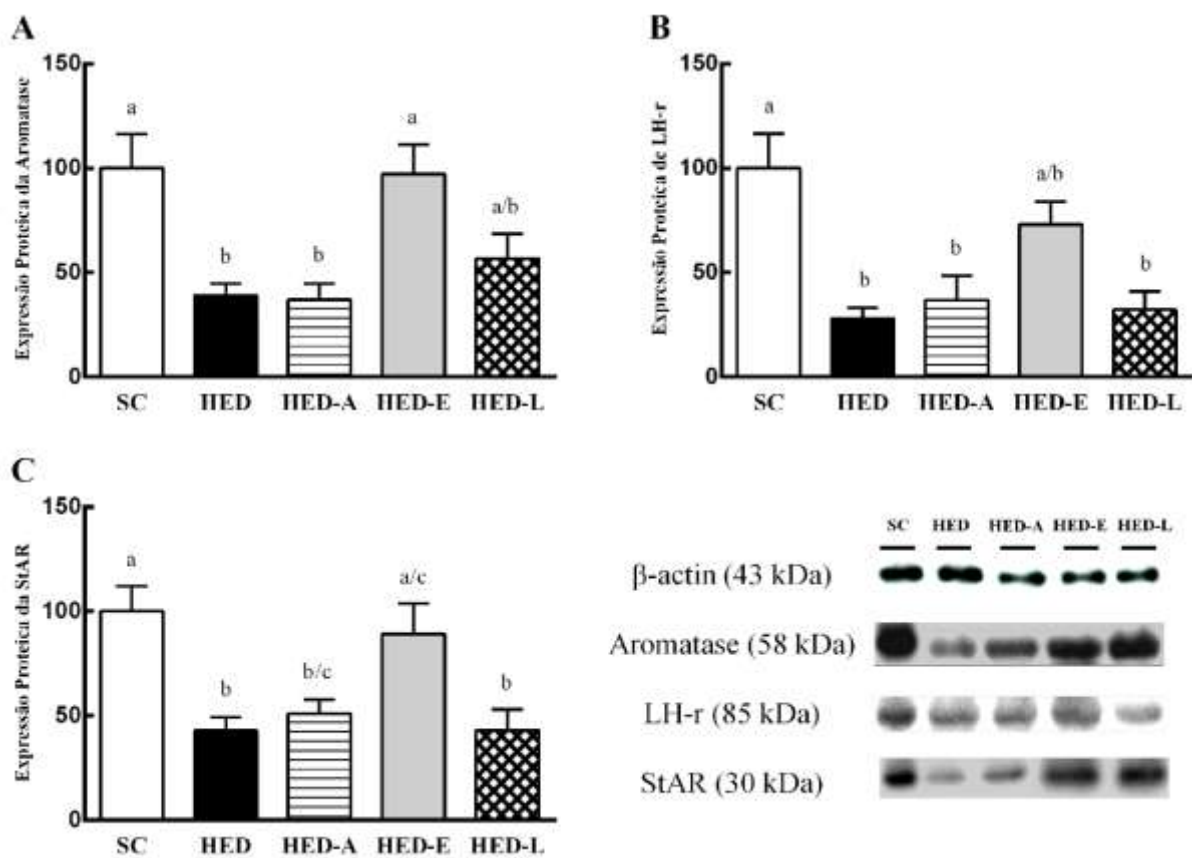
Legenda: Expressão gênica da aromatase (A), LH-r (B) e StAR (C) de camundongos alimentados com dieta padrão (SC) ou uma dieta de alta densidade energética (HED)

Nota: O grupo HED foi tratado com alisquireno (HED-A: 50 mg/kg/dia), maleato de enalapril (HED-E: 30 mg/kg/dia), losartana (HED-L: 10 mg/kg/dia) ou nenhuma droga (HED). Os valores são apresentados como média \pm EPM para 10 animais por grupo. Letras diferentes indicam significância estatística.

Fonte: O autor, 2015.

A expressão proteica apresentou redução significativa em relação aos animais do grupo SC, da enzima aromatase dos grupos HED (60,98, $P = 0,0143$) e HED-A (63,11%, $P = 0,0118$), do LH-r dos grupos HED (72,1%, $P = 0,0021$), HED-A (63,20%, $P = 0,0062$) e HED-L (67,96%, $P = 0,0035$) e da StAR dos grupos HED (57,21%, $P = 0,0091$), HED-A (49,07%, $P = 0,0261$) e HED-L (56,93%, $P = 0,0091$). Estes resultados são apresentados na figura 12.

Figura 12 - Expressão proteica da aromatase, LH-r e StAR



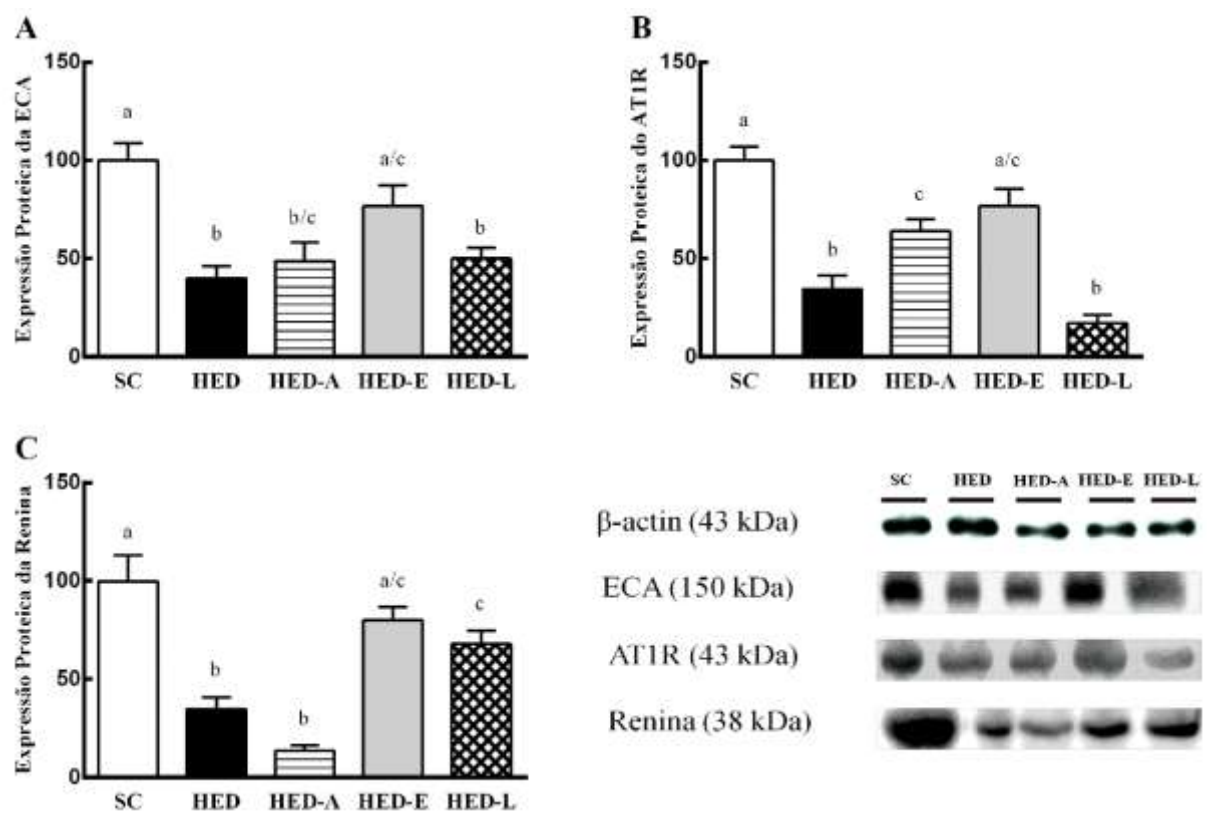
Legenda: Expressão proteica da aromatase (A), LH-r (B) e StAR (C) de camundongos alimentados com dieta padrão (SC) ou uma dieta de alta densidade energética (HED)

Nota: LeO grupo HED foi tratado com alisquireno (HED-A: 50 mg/kg/dia), maleato de enalapril (HED-E: 30 mg/kg/dia), losartana (HED-L: 10 mg/kg/dia) ou nenhuma droga (HED). Os valores são apresentados como média ± EPM para 10 animais por grupo. Letras diferentes indicam significância estatística.

Fonte: O autor, 2015.

Em relação ao SRA, a expressão proteica apresentou redução significativa em relação aos animais do grupo SC, da ECA nos grupos HED (59,98%, $P = 0,0006$), HED-A (51,2%, $P = 0,0032$) e do HED-L (50,06%, $P = 0,0035$), do AT1R nos grupos HED (65,41%, $P < 0,0001$), HED-A (43,77%, $P = 0,0055$) e HED-L (82,87%, $P < 0,0001$) e da renina nos grupos HED (65,32%, $P < 0,0001$), HED-A (86,4%, $P < 0,0001$) e HED-L (32,08%, $P = 0,0344$). Estes resultados são apresentados na figura 13.

Figura 13 - Expressão proteica da ECA, AT1R e da renina



Legenda: Expressão proteica da ECA (A), AT1R (B) e da renina (C) de camundongos alimentados com dieta padrão (SC) ou uma dieta de alta densidade energética (HED)

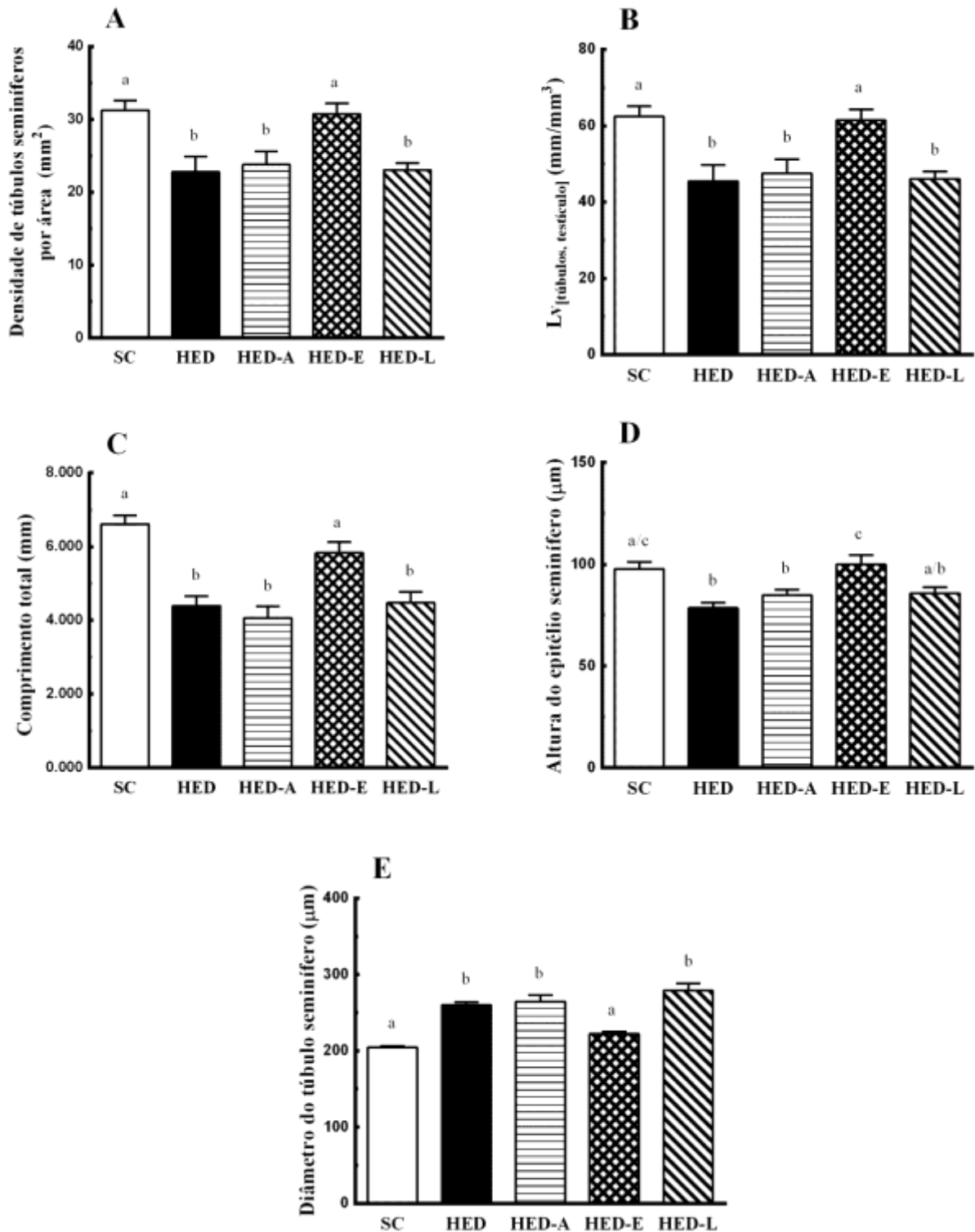
Nota: O grupo HED foi tratado com alisquireno (HED-A: 50 mg/kg/dia), maleato de enalapril (HED-E: 30 mg/kg/dia), losartana (HED-L: 10 mg/kg/dia) ou nenhuma droga (HED). Os valores são apresentados como média \pm EPM para 10 animais por grupo. Letras diferentes indicam significância estatística.

Fonte: O autor, 2015.

O volume testicular não apresentou diferença significativa entre os grupos (SC = $0,106 \pm 0,003$ / g; HED = $0,098 \pm 0,004$ / g; HED-A = $0,090 \pm 0,002$ / g; HED-E = $0,095 \pm 0,003$ / g; HED-L = $0,097 \pm 0,003$ / g).

Os dados referentes a avaliação morfométrica e estereológica são demonstrados na figura 14. A densidade dos túbulos seminíferos por área (Q_a) foi significativamente diminuído nos grupos HED (8,47%, $P = 0,0116$), HED-A (7,46%, $P = 0,0198$) e HED-L (8,19%, $P = 0,0139$), figura 14A. A densidade de comprimento ($Lv_tubules$, testículo) HED (16,95%, $P = 0,0115$), HED-A (14,92%, $P = 0,0198$) e HED-L (16,38%, $P = 0,0139$) (figura 14B), o comprimento total dos túbulos seminíferos nos grupos HED (2,22%, $P = 0,0002$), HED-A (2,55%, $P < 0,0001$) e no HED-L (2,14%, $P = 0,0002$) (figura 14C), bem como a altura do epitélio nos grupos HED (19,17%, $P = 0,0008$) e no HED-A (12,89%, $P = 0,042$) (figura 14D) foram significativamente reduzidos em relação ao grupo SC. No que diz respeito ao diâmetro dos túbulos seminíferos (figura 14E) ocorreu aumento significativo dos grupos HED (55,36%, $P < 0,0001$), HED-A (59,86%, $P < 0,0001$) e do HED-L (74,25%, $P < 0,0001$) quando comparados ao grupo SC.

Figura 14 - Densidade de túbulos seminíferos por área



Legenda: Densidade de túbulos seminíferos por área (A), L_v (B), comprimento total dos túbulos (C), altura do epitélio seminífero (D) e diâmetro do túbulo seminífero (E) de camundongos alimentados com dieta padrão (SC) ou uma dieta de alta densidade energética (HED)

Nota: O grupo HED foi tratado com alisquireno (HED-A: 50 mg/kg/dia), maleato de enalapril (HED-E: 30 mg/kg/dia), losartana (HED-L: 10 mg/kg/dia) ou nenhuma droga (HED). Os valores são apresentados como média ± EPM para 10 animais por grupo. Letras diferentes indicam significância estatística.

Fonte: O autor, 2015.

5 DISCUSSÃO

A síndrome metabólica é um transtorno complexo associado com a obesidade abdominal, aumento da PAS, aumento dos níveis de glicose e dislipidemia (142). Além disso, há uma relação inversa entre a testosterona total no plasma e a testosterona livre com a gordura visceral, e tem sido sugerido que esta relação está relacionada com uma alteração ao nível do hipotálamo-hipófise (143). Além disso, alguns estudos demonstraram que níveis mais baixos de testosterona total foram preditivos do desenvolvimento da síndrome metabólica, ao passo que outros têm sugerido que a síndrome metabólica é um fator de risco independente para o hipogonadismo em homens de meia-idade. Outros têm mostrado que a deficiência de andrógenos parece ser um marcador, em vez de ser a causa da síndrome metabólica. E ainda, a obesidade também pode estar associada a alterações na espermatogênese (143).

Dietas HED são conhecidas por aumentar a PAS e lípideos. Neste estudo, o consumo desta dieta durante oito semanas resultou em um aumento na PAS (10%), colesterol total (41%) e triglicérides (58%). Drogas que visam o bloqueio do SRA tem sido particularmente útil no tratamento da HAS (144, 145). Em geral, os fármacos anti-hipertensivos em uso atualmente foram concebidos principalmente para atuar sobre os mecanismos celulares e bioquímicos que contribuem para o aumento da PAS, e não para resolver as alterações do metabolismo lipídico que muitas vezes acompanham a hipertensão (145). Como esperado, todas as drogas usadas no presente estudo foram eficazes na redução da PAS, embora nenhuma delas tenha afetado o perfil lipídico.

O sistema reprodutor masculino, os testículos em particular, expressa todos os membros clássicos do SRA e representa tanto uma origem quanto um destino para os peptídeos ativos da angiotensina. Os papéis desempenhados pela angiotensina nesse sistema incluem a regulação da esteroidogênese pela inibição da célula de Leydig através da Ang II, alterações na contratilidade do epidídimo e função dos espermatozoides. A Ang II produzida localmente pode modular negativamente o estímulo do LH nas células de Leydig e assim inibir a esteroidogênese (16).

No presente estudo, o grupo HED apresentou além de hipercolesterolemia e HAS, níveis de testosterona, estradiol e LH diminuídos. Este resultado é consistente com a literatura, porque hipercolesterolemia e HAS são condições que afetam a função sexual (146-148). O consumo de uma dieta HED reduziu os níveis de estradiol e testosterona e a expressão

gênica e proteica dos receptores de LH que em conjunto com a expressão reduzida da StAR e da aromatase, leva a um estado de diminuição da esteroidogênese.

Apesar de normalizar a PAS, o alisquireno e o losartana não tiveram qualquer efeito adicional. No entanto, o maleato de enalapril foi capaz de normalizar todas as mudanças causadas pela dieta HED, como as reduções nos níveis de testosterona e estradiol e da expressão gênica e proteica reduzida de StAR, aromatase e LH-r.

Para esclarecer por que o maleato de enalapril foi a única droga capaz de reverter as alterações causadas pela dieta HED, a expressão proteica da ECA, renina e AT1R no testículo foram avaliadas por western blott. Como esperado a expressão da renina e AT1R foram diminuídos em animais tratados com alisquireno e com losartana. No entanto, nos animais tratados com enalapril, a expressão da ECA se manteve inalterada, o que foi uma descoberta notável do presente estudo. Nesses animais, a expressão normal da ECA parece ter sido responsável por manter a esteroidogênese. Infelizmente, neste momento, não podemos esclarecer por que o maleato de enalapril foi a única droga capaz de manter esse efeito sobre os testículos apesar de reduzir a PAS.

A morfologia do testículo pode ser alterada em várias condições de desenvolvimento, fisiológicos e patológicos e essas mudanças são refletidas pelas alterações na capacidade reprodutiva. Estudar a morfologia testicular nestas condições ou após intervenções terapêuticas baseia-se em dados quantitativos onde a análise estereológica de cortes de tecido podem fornecer informações valiosas sobre correlações estrutura-função e a capacidade funcional das células e/ou tecidos (149).

Em nosso estudo mostramos que todos os parâmetros estereológicos e morfométricos avaliados foram alterados pela dieta de alta densidade energética. O volume médio dos testículos, a densidade de túbulos seminíferos por área, a densidade de comprimento e o comprimento total dos túbulos seminíferos, bem como a altura do epitélio foram diminuídas enquanto que o diâmetro dos túbulos seminíferos foi aumentado.

Este padrão de alteração é semelhante ao que é visto em animais com o envelhecimento. Mahmoud *et al.* (150) mostrou uma diminuição do volume testicular que poderia refletir uma diminuição da massa de células de Sertoli, enquanto Sartorius & Nieschlag (151) mostraram deterioração da qualidade do sêmen e morfologia tubular alterada. Também Morales *et al.* (152) mostraram uma diminuição no diâmetro tubular, lúmen tubular, o volume do epitélio seminífero e volume total tubular assim como o comprimento total de túbulos seminíferos.

Com base nestes estudos podemos sugerir que as alterações morfológicas testiculares causadas pela hipertensão, secundárias à ingestão da dieta HED, poderiam ser um dos fatores que contribuem para a disfunção sexual, que está usualmente presente em pacientes hipertensos. Este dado corrobora o artigo publicado recentemente por nosso grupo em que mostramos que dieta HED reduz a esteroidogênese que também é um passo muito importante para manter a função sexual normal (153).

No entanto, o maleato de enalapril foi capaz de normalizar todas as mudanças causadas pela dieta HED, tanto na morfologia testicular quanto nos níveis séricos de testosterona e estradiol e na expressão gênica e proteica de StAR, aromatase e LH-r.

No sistema reprodutor masculino, a função local do SRA é sabidamente relevante para a fertilidade. Recentemente, um novo gene homólogo ao da ECA humano, que foi chamado de ECA 2 (69) ou ECAH (70) localizado no cromossomo Xp22 foi identificado. Trata-se de uma carboxipeptidase, associada à membrana e que é expressa predominantemente pelo endotélio e que não sofre a ação dos inibidores da ECA. É altamente expressa nos testículos, tecidos renais e cardiovasculares, e tecidos do sistema gastrointestinal (71). Diferentemente do que ocorre com a ECA, a ECA 2 não é inibida pelo lisinopril ou captopril (69). A expressão normal da ECA 2 deveria ser esperada no grupo tratado com maleato de enalapril, no entanto, neste trabalho não avaliamos esta proteína, e sim a ECA. O fato da expressão da ECA estar inalterada nesses animais foi um achado bastante interessante e que necessita de futuras investigações.

Sabe-se que existe uma relação inversa entre obesidade e níveis de testosterona, muito possivelmente pelos efeitos da leptina na regulação do sistema reprodutor (154, 155). No entanto, trabalhos recentes mostram o papel do SRA na regulação da esteroidogênese em condições de dieta hiperlipídica (156) ou com alta densidade energética (153).

A Ang II é o peptídeo ativo principal do SRA e tem um papel importante na regulação da esteroidogênese (118). No entanto, no testículo, parece que a Ang III é o principal mediador deste sistema (157, 158), apresentando as principais características da Ang II e se ligando aos mesmos receptores. Trabalho recente mostra ainda que a Ang III e IV são capazes de regular a esteroidogênese (156). Nossos resultados mostram que a administração do enalapril a camundongos alimentados com a dieta HED possui efeito protetor, normalizando todos os parâmetros alterados por essa dieta (morfológicos e hormonais). Entretanto, o mecanismo exato que gerou esse efeito protetor ainda é inconclusivo. Podendo ser um efeito central e a alteração no testículo ser consequente a isso, uma vez, que a maioria dos receptores da Ang II são expressos no cérebro (159).

Não podemos ignorar a hipótese da ECA 2, Ang III e IV terem um papel importante na manutenção da esteroidogênese nesses animais, assim novos estudos deverão ser realizados a fim de investigar o papel dessas enzimas.

Os resultados deste estudo reforçam a importância de escolher este medicamento anti-hipertensivo em pacientes que relatam disfunção sexual. No entanto, os efeitos adversos dos bloqueadores da ECA, os quais incluem a hipotensão, tosse, hipercalemia, dor de cabeça, tonturas, fadiga, náusea e dor de cabeça (160, 161), não devem ser negligenciados.

CONCLUSÃO

A dieta HED aumentou a PAS, alterou o perfil lipídico e os parâmetros reprodutivos, tanto hormonais quanto os morfológicos.

Todos os tratamentos (alisquireno, enalapril e losartana) foram eficazes em normalizar a PAS como esperado.

Porém, apenas o enalapril foi o medicamento capaz de reverter as alterações dos parâmetros reprodutivos, sugerindo ser a droga mais adequada para o tratamento da HAS em pacientes que apresentam disfunção reprodutiva prévia ao tratamento.

Mais estudos experimentais são necessários para esclarecer os mecanismos dos bloqueadores do SRA como terapia única ou em combinação com outras drogas, em casos de HAS associada com alteração na função reprodutiva. Os resultados apresentados neste estudo sugerem que antigas terapias, como os inibidores da ECA podem ser considerados agentes terapêuticos promissores para a alteração na função reprodutiva e suas comorbidades, uma vez que é amplamente empregado na prática clínica.

REFERÊNCIAS

1. Ello-Martin JA, Ledikwe JH, Rolls BJ. The influence of food portion size and energy density on energy intake: implications for weight management. *Am J Clin Nutr.* 2005;82(1 Suppl):236S-41S.
2. Esmailzadeh A, Boroujeni HK, Azadbakht L. Consumption of energy-dense diets in relation to cardiometabolic abnormalities among Iranian women. *Public Health Nutr.* 2012;15(5):868-75.
3. Ledikwe JH, Blanck HM, Khan LK, Serdula MK, Seymour JD, Tohill BC, et al. Low-energy-density diets are associated with high diet quality in adults in the United States. *J Am Diet Assoc.* 2006;106(8):1172-80.
4. Shamloul R, Ghanem H. Erectile dysfunction. *Lancet.* 2013;381(9861):153-65.
5. Virag R, Bouilly P, Frydman D. Is impotence an arterial disorder? A study of arterial risk factors in 440 impotent men. *Lancet.* 1985;1(8422):181-4.
6. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet.* 2005;365(9455):217-23.
7. Picon RV, Fuchs FD, Moreira LB, Riegel G, Fuchs SC. Trends in prevalence of hypertension in Brazil: a systematic review with meta-analysis. *PLoS One.* 2012;7(10):e48255.
8. Atlas SA. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm.* 2007;13(8 Suppl B):9-20.
9. Santos RA, Ferreira AJ, Verano-Braga T, Bader M. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *J Endocrinol.* 2013;216(2):R1-R17.
10. Ferrario CM, Trask AJ, Jessup JA. Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289(6):H2281-90.
11. Santos RA, Ferreira AJ, Pinheiro SV, Sampaio WO, Touyz R, Campagnole-Santos MJ. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert Opin Investig Drugs.* 2005;14(8):1019-31.
12. Coates D. The angiotensin converting enzyme (ACE). *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(6):769-73.
13. Deguchi E, Tani T, Watanabe H, Yamada S, Kondoh G. Dipeptidase-inactivated tACE action in vivo: selective inhibition of sperm-zona pellucida binding in the mouse. *Biol Reprod.* 2007;77(5):794-802.

14. Langford KG, Zhou Y, Russell LD, Wilcox JN, Bernstein KE. Regulated expression of testis angiotensin-converting enzyme during spermatogenesis in mice. *Biol Reprod.* 1993;48(6):1210-8.
15. Speth RC, Daubert DL, Grove KL. Angiotensin II: a reproductive hormone too? *Regul Pept.* 1999;79(1):25-40.
16. Leung PS, Sernia C. The renin-angiotensin system and male reproduction: new functions for old hormones. *J Mol Endocrinol.* 2003;30(3):263-70.
17. Leal MC, Pinheiro SV, Ferreira AJ, Santos RA, Bordoni LS, Alenina N, et al. The role of angiotensin-(1-7) receptor Mas in spermatogenesis in mice and rats. *J Anat.* 2009;214(5):736-43.
18. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev.* 2006;86(3):747-803.
19. Drewnowski A. The role of energy density. *Lipids.* 2003;38(2):109-15.
20. Rolls BJ, Roe LS, Meengs JS. Reductions in portion size and energy density of foods are additive and lead to sustained decreases in energy intake. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(1):11-7.
21. Jebb SA. Dietary strategies for the prevention of obesity. *Proc Nutr Soc.* 2005;64(2):217-27.
22. Levy-Costa RB, Sichieri R, Pontes NS, Monteiro CA. Household food availability in Brazil: distribution and trends (1974-2003). *Rev Saúde Pública.* 2005;39(4):530-40.
23. Levy RB, Claro RM, Mondini L, Sichieri R, Monteiro CA. Regional and socioeconomic distribution of household food availability in Brazil, in 2008-2009. *Rev Saúde Pública.* 2012;46(1):6-15.
24. Grundy SM. Metabolic syndrome pandemic. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2008;28(4):629-36.
25. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Curtin LR. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. *Jama.* 2010;303(3):235-41.
26. Duffey KJ, Popkin BM. Shifts in patterns and consumption of beverages between 1965 and 2002. *Obesity.* 2007;15(11):2739-47.
27. Swinburn B, Sacks G, Ravussin E. Increased food energy supply is more than sufficient to explain the US epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr.* 2009;90(6):1453-6.
28. Escrivão MAMS, Oliveira FLC, Taddei JAAC, Lopez FA. Obesidade exógena na infância e na adolescência. *J Pediatr.* 2000;76:305-10.
29. Organization WH. Obesity: preventing and managing the global epidemic. 1998.
30. Lopez-Fontana CM, Sanchez-Villegas A, Martinez-Gonzalez MA, Martinez JA. Daily physical activity and macronutrient distribution of low-calorie diets jointly affect body

- fat reduction in obese women. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*. 2009;34(4):595-602.
31. Devlin MJ, Goldfein JA, Petkova E, Jiang H, Raizman PS, Wolk S, et al. Cognitive behavioral therapy and fluoxetine as adjuncts to group behavioral therapy for binge eating disorder. *Obesity research*. 2005;13(6):1077-88.
 32. Romero CEM, Zanesco A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. *Revista de Nutrição*. 2006;19:85-91.
 33. Christakis NA, Fowler JH. The spread of obesity in a large social network over 32 years. *The New England journal of medicine*. 2007;357(4):370-9.
 34. Bartness TJ, Bamshad M. Innervation of mammalian white adipose tissue: implications for the regulation of total body fat. *The American journal of physiology*. 1998;275(5 Pt 2):R1399-411.
 35. Penicaud L, Cousin B, Leloup C, Lorsignol A, Casteilla L. The autonomic nervous system, adipose tissue plasticity, and energy balance. *Nutrition*. 2000;16(10):903-8.
 36. Saleh J, Sniderman AD, Cianflone K. Regulation of Plasma fatty acid metabolism. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1999;286(1-2):163-80.
 37. Ahima RS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity*. 2006;14 Suppl 5:242S-9S.
 38. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2000;11(8):327-32.
 39. Hall JE, da Silva AA, do Carmo JM, Dubinion J, Hamza S, Munusamy S, et al. Obesity-induced hypertension: role of sympathetic nervous system, leptin, and melanocortins. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(23):17271-6.
 40. Zhang R, Reisin E. Obesity-hypertension: the effects on cardiovascular and renal systems. *American journal of hypertension*. 2000;13(12):1308-14.
 41. Souza ARA, Costa A, Nakamura D, Mocheti LN, Stevanato Filho PR, Ovando LA. Um estudo sobre hipertensão arterial sistêmica na cidade de Campo Grande, MS. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2007;88:441-6.
 42. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arq Bras Cardiol*. 2010:1-40.
 43. Graudal NA, Hubeck-Graudal T, Jurgens G. Effects of low-sodium diet vs. high-sodium diet on blood pressure, renin, aldosterone, catecholamines, cholesterol, and triglyceride (Cochrane Review). *American journal of hypertension*. 2012;25(1):1-15.
 44. Salmond CE, Prior IA, Wessen AF. Blood pressure patterns and migration: a 14-year cohort study of adult Tokelauans. *American journal of epidemiology*. 1989;130(1):37-52.
 45. Bonow RO, Mann D, Zipes DP, Libby P. *Braunwald: Tratado de doenças cardiovasculares*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010.

46. Halperin RO, Sesso HD, Ma J, Buring JE, Stampfer MJ, Gaziano JM. Dyslipidemia and the risk of incident hypertension in men. *Hypertension*. 2006;47(1):45-50.
47. Moore LL, VISIONI AJ, Qureshi MM, Bradlee ML, Ellison RC, D'Agostino R. Weight loss in overweight adults and the long-term risk of hypertension: the Framingham study. *Archives of internal medicine*. 2005;165(11):1298-303.
48. Zhang Y, Lee ET, Devereux RB, Yeh J, Best LG, Fabsitz RR, et al. Prehypertension, diabetes, and cardiovascular disease risk in a population-based sample: the Strong Heart Study. *Hypertension*. 2006;47(3):410-4.
49. de Kloet AD, Krause EG, Woods SC. The renin angiotensin system and the metabolic syndrome. *Physiology & behavior*. 2010;100(5):525-34.
50. Laragh JH. Renin system blockade as a therapeutic strategy. Past, present, and future. *American journal of hypertension*. 1991;4(4 Pt 2):273S-4S.
51. Dusing R. Sexual dysfunction in male patients with hypertension: influence of antihypertensive drugs. *Drugs*. 2005;65(6):773-86.
52. Ayta IA, McKinlay JB, Krane RJ. The likely worldwide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences. *BJU international*. 1999;84(1):50-6.
53. Laumann EO, Paik A, Rosen RC. Sexual dysfunction in the United States: prevalence and predictors. *Jama*. 1999;281(6):537-44.
54. Adeniyi AF, Adeleye JO, Adeniyi CY. Diabetes, sexual dysfunction and therapeutic exercise: a 20 year review. *Current diabetes reviews*. 2010;6(4):201-6.
55. Alberti L, Torlasco C, Lauretta L, Loffi M, Maranta F, Salonia A, et al. Erectile dysfunction in heart failure patients: a critical reappraisal. *Andrology*. 2013;1(2):177-91.
56. Dzau VJ, Pratt RE. Renin-angiotensin system: biology, physiology and pharmacology. In: Haber E, Morgan H, Katz A, Fozard H, editors. *Handbook of Experimental Cardiology*. New York: Raven Press; 1986. p. pp. 1631-61.
57. Bader M, Ganten D. Update on tissue renin-angiotensin systems. *J Mol Med*. 2008;86(6):615-21.
58. Peach MJ. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiological reviews*. 1977;57(2):313-70.
59. Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI, Fabiani ME. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci (Lond)*. 2001;100(5):481-92.
60. Reid IA, Morris BJ, Ganong WF. The renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol*. 1978;40:377-410.

61. Rocha ESM, Beraldo WT, Rosenfeld G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *The American journal of physiology*. 1949;156(2):261-73.
62. Ferreira SH. A Bradykinin-Potentiating Factor (Bpf) Present in the Venom of *Bothrops Jararca*. *Br J Pharmacol Chemother*. 1965;24:163-9.
63. Ramaraj P, Kessler SP, Colmenares C, Sen GC. Selective restoration of male fertility in mice lacking angiotensin-converting enzymes by sperm-specific expression of the testicular isozyme. *The Journal of clinical investigation*. 1998;102(2):371-8.
64. Turner AJ, Hooper NM. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends in pharmacological sciences*. 2002;23(4):177-83.
65. Ryan MJ, Sigmund CD. ACE, ACE inhibitors, and other JNK. *Circulation research*. 2004;94(1):1-3.
66. Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Hubert C, Allegrini J, John M, Tregear G, et al. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(24):9386-90.
67. Skidgel RA, Erdos EG. Novel activity of human angiotensin I converting enzyme: release of the NH₂- and COOH-terminal tripeptides from the luteinizing hormone-releasing hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985;82(4):1025-9.
68. Skidgel RA, Erdos EG. Angiotensin converting enzyme (ACE) and neprilysin hydrolyze neuropeptides: a brief history, the beginning and follow-ups to early studies. *Peptides*. 2004;25(3):521-5.
69. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation research*. 2000;87(5):E1-9.
70. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(43):33238-43.
71. Harmer D, Gilbert M, Borman R, Clark KL. Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. *FEBS letters*. 2002;532(1-2):107-10.
72. Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(17):14838-43.
73. Clarke NE, Turner AJ. Angiotensin-converting enzyme 2: the first decade. *International journal of hypertension*. 2012;2012:307315.

74. Kaschina E, Unger T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press*. 2003;12(2):70-88.
75. Frantz EDC. Bloqueadores do sistema renina-angiotensina em ilhotas pancreáticas e fígado na obesidade induzida por dieta em camundongos. 2014. 99f. Doutorado em Ciências (Biologia Humana e Experimental) - Insituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
76. Kramkowski K, Mogielnicki A, Buczko W. The physiological significance of the alternative pathways of angiotensin II production. *J Physiol Pharmacol*. 2006;57(4):529-39.
77. Santos RA, Ferreira AJ, Verano-Braga T, Bader M. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *The Journal of endocrinology*. 2013;216(2):R1-R17.
78. Ribeiro-Oliveira A, Jr., Nogueira AI, Pereira RM, Boas WW, Dos Santos RA, Simoes e Silva AC. The renin-angiotensin system and diabetes: an update. *Vasc Health Risk Manag*. 2008;4(4):787-803.
79. Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(14):8258-63.
80. Santos SH, Braga JF, Mario EG, Porto LC, Rodrigues-Machado Mda G, Murari A, et al. Improved lipid and glucose metabolism in transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1-7). *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(5):953-61.
81. Santos RA, Castro CH, Gava E, Pinheiro SV, Almeida AP, Paula RD, et al. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. *Hypertension*. 2006;47(5):996-1002.
82. Xu P, Costa-Goncalves AC, Todiras M, Rabelo LA, Sampaio WO, Moura MM, et al. Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in MAS gene-deleted mice. *Hypertension*. 2008;51(2):574-80.
83. Jin HY, Song B, Oudit GY, Davidge ST, Yu HM, Jiang YY, et al. ACE2 deficiency enhances angiotensin II-mediated aortic profilin-1 expression, inflammation and peroxynitrite production. *PLoS One*. 2012;7(6):e38502.
84. Ferrario CM, Ahmad S, Joyner J, Varagic J. Advances in the renin angiotensin system focus on angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7). *Adv Pharmacol*. 2010;59:197-233.
85. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiological reviews*. 2006;86(3):747-803.
86. Nguyen G, Contrepas A. Physiology and pharmacology of the (pro)renin receptor. *Current opinion in pharmacology*. 2008;8(2):127-32.

87. Brown MJ. Aliskiren. *Circulation*. 2008;118(7):773-84.
88. Staessen JA, Li Y, Richart T. Oral renin inhibitors. *Lancet*. 2006;368(9545):1449-56.
89. Dong YF, Liu L, Kataoka K, Nakamura T, Fukuda M, Tokutomi Y, et al. Aliskiren prevents cardiovascular complications and pancreatic injury in a mouse model of obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2010;53(1):180-91.
90. Parving HH, Brenner BM, McMurray JJ, de Zeeuw D, Haffner SM, Solomon SD, et al. Baseline characteristics in the Aliskiren Trial in Type 2 Diabetes Using Cardio-Renal Endpoints (ALTITUDE). *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2012;13(3):387-93.
91. Silva P. *Farmacologia*. 8ª Ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010. 1352 p.
92. Ferguson RK, Turini GA, Brunner HR, Gavras H, McKinstry DN. A specific orally active inhibitor of angiotensin-converting enzyme in man. *Lancet*. 1977;1(8015):775-8.
93. Nedogoda SV, Ledyeva AA, Chumachok EV, Tsoma VV, Mazina G, Salasyuk AS, et al. Randomized trial of perindopril, enalapril, losartan and telmisartan in overweight or obese patients with hypertension. *Clinical drug investigation*. 2013;33(8):553-61.
94. Goodman LS, Gilman A, Brunton LL, Chabner BA, Knollman BC. *Goodman & Gilman. As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 12 ed. New York: Mcgraw Hill; 2012. 2112 p.
95. Setchell BP, Breed WG. *Anatomy, vasculature, and innervation of the male reproductive tract*. 3 ed. New York: Elsevier; 2006.
96. Tortora GJ, Derrickson B. *Princípios de anatomia e fisiologia*. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.
97. Russel LD, Ettlin RA, Hikim APS, Clegg ED. *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. 1 ed. United States 1990.
98. Russell LD, de Franca LR. Building a testis. *Tissue & cell*. 1995;27(2):129-47.
99. Carreau S, Lambard S, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bilinska B, Bourguiba S. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2003;1:35.
100. Hess RA. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2003;1:52.
101. Kerr JB, Loveland KL, O'Bryan MK, de Krester DM. *Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms*. 3 ed: Elsevier; 2006.
102. Bustos-Obregon E. Ultrastructure and function of the lamina propria of mammalian seminiferous tubules. *Andrologia*. 1976;8(3):179-85.

103. Christl HW. The lamina propria of vertebrate seminiferous tubules: a comparative light and electron microscopic investigation. *Andrologia*. 1990;22(1):85-94.
104. Dym M. The mammalian rete testis--a morphological examination. *The Anatomical record*. 1976;186(4):493-523.
105. Hess RA, Renato de Franca L. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Advances in experimental medicine and biology*. 2008;636:1-15.
106. Russell LD, Corbin TJ, Borg KE, De Franca LR, Grasso P, Bartke A. Recombinant human follicle-stimulating hormone is capable of exerting a biological effect in the adult hypophysectomized rat by reducing the numbers of degenerating germ cells. *Endocrinology*. 1993;133(5):2062-70.
107. Skinner MK, Anway MD. Seminiferous cord formation and germ-cell programming: epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005;1061:18-32.
108. Russell LD, Kershaw M, Borg KE, El Shennawy A, Rulli SS, Gates RJ, et al. Hormonal regulation of spermatogenesis in the hypophysectomized rat: FSH maintenance of cellular viability during pubertal spermatogenesis. *Journal of andrology*. 1998;19(3):308-19; discussion 41-2.
109. Simard J, Ricketts ML, Gingras S, Soucy P, Feltus FA, Melner MH. Molecular biology of the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family. *Endocrine reviews*. 2005;26(4):525-82.
110. Contreras L, Medina MH, Andrade S, Oppliger V, Correa JA. Effects of copper on early developmental stages of *Lessonia nigrescens* Bory (Phaeophyceae). *Environmental pollution*. 2007;145(1):75-83.
111. Payne AH, Youngblood GL. Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biol Reprod*. 1995;52(2):217-25.
112. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Jr., Shagoury JK, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *The New England journal of medicine*. 2003;349(17):1614-27.
113. de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(19):10972-6.
114. Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-Criado JE, et al. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology*. 2004;145(10):4565-74.
115. Roa J, Castellano JM, Navarro VM, Handelsman DJ, Pinilla L, Tena-Sempere M. Kisspeptins and the control of gonadotropin secretion in male and female rodents. *Peptides*. 2009;30(1):57-66.

116. Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, et al. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology*. 2005;146(7):2976-84.
117. Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, Baltogiannis D, Giannakis D, Pardalidis N. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2008;109(3-5):323-30.
118. Ling N, Ying SY, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M, et al. Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. *Nature*. 1986;321(6072):779-82.
119. Robertson DM, de Vos FL, Foulds LM, McLachlan RI, Burger HG, Morgan FJ, et al. Isolation of a 31 kDa form of inhibin from bovine follicular fluid. *Molecular and cellular endocrinology*. 1986;44(3):271-7.
120. Carreau S, Hess RA. Oestrogens and spermatogenesis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2010;365(1546):1517-35.
121. Saunders PT, Sharpe RM, Williams K, Macpherson S, Urquart H, Irvine DS, et al. Differential expression of oestrogen receptor alpha and beta proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates. *Molecular human reproduction*. 2001;7(3):227-36.
122. Fisher JS, Millar MR, Majdic G, Saunders PT, Fraser HM, Sharpe RM. Immunolocalisation of oestrogen receptor-alpha within the testis and excurrent ducts of the rat and marmoset monkey from perinatal life to adulthood. *J Endocrinol*. 1997;153(3):485-95.
123. Stocco DM. The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *J Endocrinol*. 2000;164(3):247-53.
124. Martinez-Arguelles DB, Papadopoulos V. Epigenetic regulation of the expression of genes involved in steroid hormone biosynthesis and action. *Steroids*. 2010;75(7):467-76.
125. Russell DW, Wilson JD. Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annual review of biochemistry*. 1994;63:25-61.
126. Dzau VJ, Ellison KE, Brody T, Ingelfinger J, Pratt RE. A comparative study of the distributions of renin and angiotensinogen messenger ribonucleic acids in rat and mouse tissues. *Endocrinology*. 1987;120(6):2334-8.
127. Campbell DJ, Habener JF. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *The Journal of clinical investigation*. 1986;78(1):31-9.
128. Hellmann W, Suzuki F, Ohkubo H, Nakanishi S, Ludwig G, Ganten D. Angiotensinogen gene expression in extrahepatic rat tissues: application of a solution hybridization assay. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 1988;338(3):327-31.

129. Vinson GP, Saridogan E, Puddefoot JR, Djahanbakhch O. Tissue renin-angiotensin systems and reproduction. *Human reproduction*. 1997;12(4):651-62.
130. El-Dorry HA, Bull HG, Iwata K, Thornberry NA, Cordes EH, Soffer RL. Molecular and catalytic properties of rabbit testicular dipeptidyl carboxypeptidase. *The Journal of biological chemistry*. 1982;257(23):14128-33.
131. Lattion AL, Soubrier F, Allegrini J, Hubert C, Corvol P, Alhenc-Gelas F. The testicular transcript of the angiotensin I-converting enzyme encodes for the ancestral, non-duplicated form of the enzyme. *FEBS letters*. 1989;252(1-2):99-104.
132. Ehlers MR, Fox EA, Strydom DJ, Riordan JF. Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme: the testis isozyme is identical to the C-terminal half of endothelial angiotensin-converting enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(20):7741-5.
133. Williams TA, Barnes K, Kenny AJ, Turner AJ, Hooper NM. A comparison of the zinc contents and substrate specificities of the endothelial and testicular forms of porcine angiotensin converting enzyme and the preparation of isoenzyme-specific antisera. *The Biochemical journal*. 1992;288 (Pt 3):875-81.
134. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993;123(11):1939-51.
135. Pereira LM, Bezerra DG, Machado DL, Mandarim-de-Lacerda CA. Enalapril attenuates cardiorenal damage in nitric-oxide-deficient spontaneously hypertensive rats. *Clinical science*. 2004;106(3):337-43.
136. Chu KY, Lau T, Carlsson PO, Leung PS. Angiotensin II type 1 receptor blockade improves beta-cell function and glucose tolerance in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2006;55(2):367-74.
137. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2008;22(3):659-61.
138. Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie*. 1970;26(1):57-60.
139. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156-9.
140. Tschanz SA, Burri PH, Weibel ER. A simple tool for stereological assessment of digital images: the STEPanizer. *J Microsc*. 2011;243(1):47-59.
141. Mandarim-de-Lacerda CA, Fernandes-Santos C, Aguila MB. Image analysis and quantitative morphology. *Methods Mol Biol*. 2010;611:211-25.
142. Tadic M, Ivanovic B, Cuspidi C. Metabolic syndrome and right ventricle: an updated review. *European journal of internal medicine*. 2013;24(7):608-16.

143. Mah PM, Wittert GA. Obesity and testicular function. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010;316(2):180-6.
144. Bisognano JD, Cody RJ. The renin-angiotensin system antagonism in the treatment of hypertension. *Current hypertension reports*. 1999;1(4):275-7.
145. Meredith PA. Angiotensin II receptor antagonists alone and combined with hydrochlorothiazide: potential benefits beyond the antihypertensive effect. *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions*. 2005;5(3):171-83.
146. Balasubramanian P, Jagannathan L, Mahaley RE, Subramanian M, Gilbreath ET, Mohankumar PS, et al. High fat diet affects reproductive functions in female diet-induced obese and dietary resistant rats. *Journal of neuroendocrinology*. 2012;24(5):748-55.
147. Erdemir F, Atilgan D, Markoc F, Boztepe O, Suha-Parlaktas B, Sahin S. [The effect of diet induced obesity on testicular tissue and serum oxidative stress parameters]. *Actas urologicas espanolas*. 2012;36(3):153-9.
148. Liu GL, Zhang YM, Dai DZ, Ding MJ, Cong XD, Dai Y. Male hypogonadism induced by high fat diet and low dose streptozotocin is mediated by activated endoplasmic reticulum stress and IkappaBbeta and attenuated by argirein and valsartan. *European journal of pharmacology*. 2013;713(1-3):78-88.
149. Noorafshan A. Stereology as a valuable tool in the toolbox of testicular research. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft*. 2014;196(1):57-66.
150. Mahmoud AM, Goemaere S, El-Garem Y, Van Pottelbergh I, Comhaire FH, Kaufman JM. Testicular volume in relation to hormonal indices of gonadal function in community-dwelling elderly men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(1):179-84.
151. Sartorius GA, Nieschlag E. Paternal age and reproduction. *Human reproduction update*. 2010;16(1):65-79.
152. Morales E, Horn R, Pastor LM, Santamaria L, Pallares J, Zuasti A, et al. Involution of seminiferous tubules in aged hamsters: an ultrastructural, immunohistochemical and quantitative morphological study. *Histology and histopathology*. 2004;19(2):445-55.
153. Alves-Pereira JL, Frantz ED, da Fonte Ramos C. Beneficial effects of Renin-Angiotensin system blockers on testicular steroidogenesis. *The Journal of urology*. 2014;192(6):1878-83.
154. Jayaraman A, Lent-Schochet D, Pike CJ. Diet-induced obesity and low testosterone increase neuroinflammation and impair neural function. *Journal of neuroinflammation*. 2014;11:162.
155. Luukkaa V, Pesonen U, Huhtaniemi I, Lehtonen A, Tilvis R, Tuomilehto J, et al. Inverse correlation between serum testosterone and leptin in men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1998;83(9):3243-6.

156. Martinez-Martos JM, Arrazola M, Mayas MD, Carrera-Gonzalez MP, Garcia MJ, Ramirez-Exposito MJ. Diet-induced hypercholesterolemia impaired testicular steroidogenesis in mice through the renin-angiotensin system. *General and comparative endocrinology*. 2011;173(1):15-9.
157. de la Chica-Rodriguez S, Cortes-Denia P, Ramirez-Exposito MJ, de Saavedra JM, Sanchez-Agesta R, Perez Mdel C, et al. In vivo administration of doxazosin in rats highly decreases serum circulating levels of testosterone through a mechanism involving the testicular renin-angiotensin system. *International journal of andrology*. 2008;31(3):364-70.
158. Reaux A, Fournie-Zaluski MC, Llorens-Cortes C. Angiotensin III: a central regulator of vasopressin release and blood pressure. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2001;12(4):157-62.
159. Bader M, Ganten D. Update on tissue renin-angiotensin systems. *Journal of molecular medicine*. 2008;86(6):615-21.
160. Brown NJ, Vaughan DE. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation*. 1998;97(14):1411-20.
161. Fein A. ACE inhibitors worsen inflammatory pain. *Medical hypotheses*. 2009;72(6):757.

Beneficial Effects of Renin-Angiotensin System Blockers on Testicular Steroidogenesis

Jorge Luiz Alves-Pereira, Eliete Dalla Corte Frantz and Cristiane da Fonte Ramos*

From the Laboratory of Morphometry, Metabolism and Cardiovascular Disease, Biomedical Center, Institute of Biology, State University of Rio de Janeiro, Brazil

Abbreviations and Acronyms

ACE = angiotensin-converting enzyme
 Ang II = angiotensin II
 AT1R = angiotensin type 1 receptor
 HED = high energy density diet
 HED-A = HED plus aliskiren
 HED-E = HED plus enalapril
 HED-L = HED plus losartan
 LH = luteinizing hormone
 LH-r = LH receptor
 PCR = polymerase chain reaction
 RAS = renin-angiotensin system
 SC = standard chow
 StAR = steroidogenic acute regulatory protein

Accepted for publication May 18, 2014.
 Study received State University of Rio de Janeiro animal ethics committee approval.
 Supported by the Brazilian Council of Science and Technology, Rio de Janeiro State Foundation for Scientific Research and the Histocompatibility Laboratory via CAPES PRO-ENSINO-SAUDE 18A0011.

* Correspondence: Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doença Cardiovascular, Centro Biológico, Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av. 28 de Setembro 87 s/b, 20551-000 Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil (telephone: +55 21 2863-8380; FAX: +55 21 2863-8322; e-mail: cristiane@pesquisador.ufrj.br)

See Editorial on page 1599.

Purpose: We evaluated whether antihypertensive drugs that act through the renin-angiotensin system would affect testis function.

Materials and Methods: Ten mice were fed standard chow and 40 received a high energy density diet. At 8 weeks the high energy density diet mice were divided into 4 groups of 10 each. The untreated group received the high energy density diet alone. The 3 treated groups received that diet plus aliskiren (50 mg/kg daily), enalapril (30 mg/kg daily) and losartan (10 mg/kg daily), respectively, for the next 6 weeks. Blood pressure was measured twice monthly. At the end of the treatment period all mice were sacrificed. One-way ANOVA and the Holm-Sidak post hoc test were used to analyze results.

Results: The high energy density diet led to a significant increase in blood pressure ($p < 0.05$). All treatments resulted in normalized blood pressure. In regard to reproductive function, and serum testosterone and estradiol the gene and protein expression of StAR, aromatase and luteinizing hormone receptor, and the protein expression of angiotensin-converting enzyme, renin and angiotensin type 1 receptor blocker were significantly decreased by the high energy density diet. Of the treatments only enalapril reverted the changes. Also, angiotensin-converting enzyme, angiotensin type 1 receptor blocker and renin protein expression were lower in all high energy density diet groups except the group that received enalapril.

Conclusions: Only angiotensin-converting enzyme inhibitor reverted the hormonal and testis alterations caused by the high energy density diet. This suggests that enalapril should be the drug of choice for a patient who presents with previous reproductive dysfunction.

Key Words: testis, diet, hypercholesterolemia, hypertension, enalapril

ARTERIAL systemic hypertension, which is considered a risk factor for male reproductive health,^{1,2} has the potential to disturb spermatogenesis and androgen production.³ This risk is important because hypertension affects up to 20% of the adult population.⁴ It has a role in approximately 55% of the global mortality caused by cardiovascular diseases and 7% of all disability adjusted life-years.⁵

Because of the high prevalence of hypertension in the population, several drugs that block the RAS at different levels are available and widely prescribed.

In the male reproductive system RAS components are localized to testicular Leydig cells, epididymal epithelial cells, the epididymal fat pad and the prostatic glandular epithelium, and they regulate several organ

APÊNDICE B - Ficha catalográfica de cartilha educativa da linha de ensino em saúde.

Parte do projeto de doutorado do autor, desenvolvido no Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental da UERJ apoiado pelo edital CAPES PRO-ENSINO-SAÚDE 1654/2011. Disponível em: www.bhex.uerj.br

**CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A**

A474 Alves-Pereira, Jorge Luiz.

Doenças da próstata: hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata / Jorge Luiz Alves- Pereira; coordenador: Luís Cristóvão Sobrinho Porto. - Rio de Janeiro, 2013. 11 f.: il.

Financiamento: CAPES Pro-ensino-Saúde 1654/2011.

1. Próstata. 2. Hiperplasia prostática. 3. Neoplasias da próstata. 4. Doenças prostáticas. I. Porto, Luis Cristóvão Sobrinho Porto. II. Doenças da próstata: Hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata.

CDU 616.65

ANEXO A - Comitê de ética e pesquisa.



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/010/2013 sobre "Avaliação do sistema renina angiotensina (SRA) no sistema urogenital de camundongos alimentados pr dieta high fat", sob a responsabilidade de **Cristiane da Fonte Ramos**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **27/03/2013**. Este certificado expira em **27/03/2016**.

Rio de Janeiro, 27 de Março de 2013.

Patricia C. Lisboa

Israel Felzenszwalb

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa

CEUA/IBRAG/UERJ

Profª Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva


Profª Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ

Matricula 34765-8

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb

CEUA/IBRAG/UERJ

ANEXO B - Confirmação de submissão do segundo artigo científico.


THE JOURNAL of UROLOGY
 Official Journal of the American Urological Association | www.urology.com

Powered by Editorial Manager
 Role: Author | Username: Cristiane Ramos

[HOME](#) • [LOGOUT](#) • [HELP](#) • [REGISTER](#) • [UPDATE MY INFORMATION](#) • [JOURNAL OVERVIEW](#)
[MAIN MENU](#) • [CONTACT US](#) • [SUBMIT A MANUSCRIPT](#) • [INSTRUCTIONS FOR AUTHORS](#)

Submissions Needing Revision for Author Cristiane Fonte Ramos, PhD

Click 'File Inventory' to download the source files for the manuscript. Click 'Revise Submission' to submit a revision of the manuscript. If you Decline To Revise the manuscript, it will be moved to the Declined Revisions folder.
 IMPORTANT: If your revised files are not ready to be submitted, do not click the 'Revise Submission' link.

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Date Revision Due	Status Date	Current Status	View Decision
Action links	30-14-1997	Beneficial Effects of Renin-Angiotensin System Blockers on Testicular Morphology.	Oct 08, 2014	Jan 21, 2015	Nov 21, 2014	Revise	Review

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

[← Author Main Menu](#)