

**Alécio Matos Pereira**

**Presença da Angiotensina-(1-7) no testículo de camundongo e efeitos sobre  
a esteroidogênese e tecido adiposo epididimal**

**Teresina  
Estado do Piauí – Brasil  
Janeiro – 2008**

**Presença da Angiotensina-(1-7) no testículo de camundongo e efeitos sobre  
a esteroidogênese e tecido adiposo epididimal**

Alécio Matos Pereira

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa

Co-Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Adelina Martha dos Reis

Dissertação do programa de Pós-graduação do  
Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do  
Piauí, como parte dos requisitos para obtenção do título  
de Mestre em Ciência Animal. Área de Concentração:  
Reprodução Animal.

**Teresina  
Estado do Piauí – Brasil  
Janeiro – 2008**

A368e Pereira, Alécio Matos

**Presença da Angiotensina-(1-7) no testículo de camundongo e efeitos sobre a esteroidogênese e tecido adiposo epididimal / Alécio Matos Pereira. Teresina: UFPI, 2007.76f.**

**Dissertação (Mestrado) UFPI.**

**1. Reprodução. 2. Ang-(1-7). 3. testículo. 4. esteroidogênese. I. Título.**

**C.D.D. – 640.1**

Universidade Federal do Piauí  
Centro de Ciências Agrárias  
Programa de Pós-Graduação em ciência Animal

**Dissertação intitulada:** Presença da Ang-(1-7) no testículo de camundongo e efeitos sobre a esteroidogênese e tecido adiposo epididimal de autoria do mestrando Alécio Matos Pereira.

---

Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa – UFPI

---

Prof<sup>ª</sup>.Dr<sup>ª</sup>. Adelina Martha dos Reis  
Co-Orientadora

---

Prof Dr. Gregório Elias Nunes Viana

---

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal  
Centro de Ciência Agrária - CCA-UFPI

Teresina/ Janeiro

*DEDICATÓRIA*

*Dedico esta dissertação para meu pai Miguel Machado Pereira e  
minha mãe Vera Lúcia de Matos Pereira pelo apoio incondicional.*

*Aos amigos Amilton, Adelina e  
Gregório pelos seus  
exemplos humanos de paciência e dedicação*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser o regente e autor de todas as obras. Agradeço também a todos os seus trabalhadores anônimos que estão sempre me conduzindo a passos mais nobres.

Ao Prof Amilton Paulo Raposo Costa pela orientação desde a graduação com afinco, amizade e dedicação. Sendo ele responsável pelos meus primeiros passos no mundo da ciência e autor de lições fundamentais que se estende da ética ao carisma.

A Prof<sup>a</sup>. Adelina Martha dos Reis, pelas constantes orientações, dedicação, paciência, amizade e exemplo de renúncias e de esforços para progresso da ciência, que levarei comigo para toda a vida.

Ao Prof Gregório pela sua orientação no domínio e utilização das técnicas e participando de todas as etapas do desenvolvimento dessa dissertação. Pelo seu companheirismo na estadia em Belo Horizonte regado com muito bife e cuscuz, junto às muitas lições de trabalho e humildade.

À Prof<sup>a</sup>. Dra<sup>a</sup> Umeko Marubayashi, pela presteza com que sempre atendeu as minhas solicitações, e por estar sempre disposta a ajudar me em qualquer situação, profissional ou pessoal.

Ao Prof. Dr. Cândido Celso Coimbra, um amigo que sempre esteve a disposição para colaborar nas diversas situações do dia a dia.

Ao Prof. Dr. Robson Augusto de Sousa Santos, por colaborar com nossas atividades disponibilizando seu laboratório e por sua constante atenção diante das dificuldades.

Aos amigos de laboratório, Alex, Ana Cristina, Ana Lúcia, Ana Luíza, André, Augusto, Bruna, Cláudio, Daniel, Danusa, Enrico, Fabiano, Gregório, Janine, Karine, Laura, Luciana, Márcia, Marcivane, Michelle, Najara, Patrícia, Renato, Samuel, Simonton, Virgínia, pelo companheirismo e convivência. Pelos inúmeros sorrisos juntos.

Ao meu grande irmão Arnon, por contribuir e compreender minha difícil caminhada pelas veredas da ciência.

Ao Kinulpe e por sua disposição e colaboração como um grande amigo que veio somar na construção dessa dissertação. E também a sua esposa, Maria Elvira, por suas deliciosas tortas.

Aos meus amigos do Piuai: Mardone, Rui, Tupã, Cláudio, Luis Carlos, Jaislan, Everdan, Mario Fernando, Serjão, Firmininho por sua irmandade e companheirismo.

A Dona Mirian e Dona Baica (mãe do Mário Fernando e avó) por ser pessoa impar de muita fé sendo para mim exemplos de simpatia, gentileza e força.

Ao meu grande irmão João Evangelista, que foi morar comigo em Belo Horizonte, sendo ele também de suma importância e incentivo nas conquistas que venho obtendo na minha vida.

A minha amiga Marcinha que sempre esteve presente comigo em todos os momentos em BH em dando força com seu entusiasmo e amizade sincera.

Aos meus amigos da Renal e Hipertensão: Ricardo, Fabrício, Érika, Serginho, Eder, Rodrigo, Gonzaga, Sonia, Eder, Zezé, Marina, Ary, Serjão, Anderson, pelas portas sempre abertas e amizade.

Aos meus amigos e professores, César, Pezzi e Mauricio, companheiros de almoço e sorrisos. Grandes homens que tenho a oportunidade de ter como amigos e exemplos de dedicação e esforços.

Aos meus amigos Aderson, Cláudia e Glícia pela convivência que foi fundamental para muitos momentos durante essa etapa, com muitas pizzas e jantares maravilhosos feitos pela Cláudia.

Aos técnicos André Pimenta, Patrícia e Janine pela prestatividade e competência para solucionar problemas dentro do laboratório que tornaram possíveis o desenvolvimento dessa dissertação.

Aos meus vizinhos em Belo Horizonte que foram importantes para que eu me sentisse acolhido, Ana, Carlos, Taty, Lívia.



Ao amigo Marco Túlio pela sua prestatividade e cooperação sendo os animais dos seus experimentos fundamentais para o início dessa dissertação.

A minha querida amiga Nina fundamental para o meu pequeno progresso no inglês.

À Maria Célia (Celinha), a secretária da Pós-Graduação, pelo carinho e paciência e por ter dançando forró comigo sempre que fui aula de dança do ICB.

Ao Luis e Vicente pela sua dedicação a pós-graduação sendo estes sempre prestativos a qualquer dificuldade no desenvolver das minhas disciplinas.

Ao grande Darcy, pessoa que sempre esteve à disposição para ajudar em tudo aquilo que estava ao seu alcance.

À Universidade Federal de Minas Gerais, pelo acolhimento.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho, que por sinal são muitos.

## LISTA DE ABREVIACÕES

Ang-(1-7) .....	Angiotensina-(1-7)
Ang II .....	Angiotensina II
Ang-(1-9) .....	Angiotensina-(1-9)
Ang III .....	Angiotensina III
Ang IV.....	Angiotensina IV
A-779 .....	D-Ala <sup>7</sup> -Angiotensina-(1-7)
DAB.....	Diaminobenzidina
ECA.....	Enzima conversora de angiotensina
PEP .....	Prolil endopeptidase
NEP .....	Endopeptidase neutra
PCP .....	Prolil carboxipeptidase
hCG .....	Gonadotrofina coriônica humana
LH .....	Hormônio luteinizante
FSH .....	Hormônio folículo estimulante
PGF <sub>2</sub> α .....	Prostaglandina F <sub>2</sub> α
PGE <sub>2</sub> .....	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGI .....	Prostaglandina I
LDL .....	Lipoproteínas de baixa densidade
HDL .....	Lipoproteínas de alta densidade
StAR .....	Steroid acute regulatory protein
P450scs.....	Enzima de clivagem de cadeia lateral de colesterol
3βHSD.....	3β Hidroxiesteroide desidrogenase
P450c17.....	P450 17α hidroxilase

## SUMÁRIO

1- Introdução .....	01
1.1-Esteroidogênese Testicular.....	06
1.2- Sistema Renina Angiotensina no Sistema Reprodutor .....	10
1.2.1- Angiotensinogênio .....	10
1.2.2- Renina .....	10
1.2.3- Enzima Conversora de Angiotensina .....	11
1.2.4- Receptores Ang II.....	11
1.2.5- Ang-(1-7) e Receptor MAS.....	12
2- Objetivos .....	13
2.1 -Objetivo geral .....	13
2.3 - Objetivos específicos .....	13
3 – Capítulo .....	15
Título: Presença da Angiotensina-(1-7) no testículo de camundongo e efeitos sobre a esteroidogênese e tecido adiposo epididimal	
Resumo	
Abstract	
3.1 Introdução.....	18
4 - Material e Métodos.....	21
4.1 Animais.....	21
4.2 Protocolo Experimental .....	21
4.3 Preparo de tecidos para imuno-histoquímica.....	22
4.4 Imuno-histoquímica.....	23
4.5 Radioimunoensaio .....	23
4.6 Análise estatística .....	24
5 - Resultado e Discussão .....	24
5.1 Efeito da Ang-(1-7) sobre liberação de testosterona .....	24
5.2 Resposta dos tecidos aos diferentes tratamentos .....	26
5.3 Imuno-histoquímica.....	30

6 - Referências .....	32
7 - Referências Gerais.....	40

## 1- Introdução

Há mais de um século atrás, Tiegerstedt e Bergaman (1898) descreveram o primeiro componente do Sistema Renina-Angiotensina SRA. Esses autores observaram que extratos não purificados do córtex renal causavam aumento prolongado na pressão arterial de coelhos anestesiados, ao contrário de extratos da medula renal que eram inativos. A essa descoberta foi dada pouca relevância até que Goldblatt et al (1934) induziram hipertensão em cães restringindo o fluxo sanguíneo para os rins. Embora conhecendo que o aumento da pressão sanguínea poderia ser causada por substância presente no sangue, os autores não associaram este efeito à renina, de modo que eles não citaram o trabalho de Tiegerstedt e Bergaman (1898).

Em 1940 dois grupos de pesquisadores trabalhando independentemente um na Argentina Braun- Menendez et al. (1940) e outro nos EUA, Page e Helmer (1940) verificaram que na verdade o peptídeo pressórico não era a renina, e sim um produto da ação enzimática dessa substância sobre uma proteína plasmática. O primeiro grupo de pesquisa chamou esse produto de hipertensina e o segundo grupo de angiotonina. Posteriormente, passaram a chamar de angiotensina, na tentativa de unificar o nome (BRAUN-MENENDEZ, PAGE, 1958).

Na mesma linha de pesquisa, Skeggs et al. (1954) identificaram duas formas de angiotensina, Angiotensina I ( Ang I) Angiotensina II (Ang II), verificando também que a primeira era resultado hidrólise de angiotensinogênio e a segunda da quebra enzimática da primeira.

Depois de várias décadas de pesquisas o sistema renina-angiotensina (SRA) é considerado um dos mais importantes sistemas regulatórios para a homeostase cardiovascular e equilíbrio do hidroeletrólítico (SANTOS, et al., 2000; SANTOS, et al., 2000b). A influência desse sistema

sobre as funções orgânicas é extremamente ampla e complexa, envolvendo múltiplos mediadores, múltiplos receptores e mecanismos de sinalização intracelular variados (SANTOS et al, 2000; ARDAILLOU, 1999; KIM e IWAO, 2001)

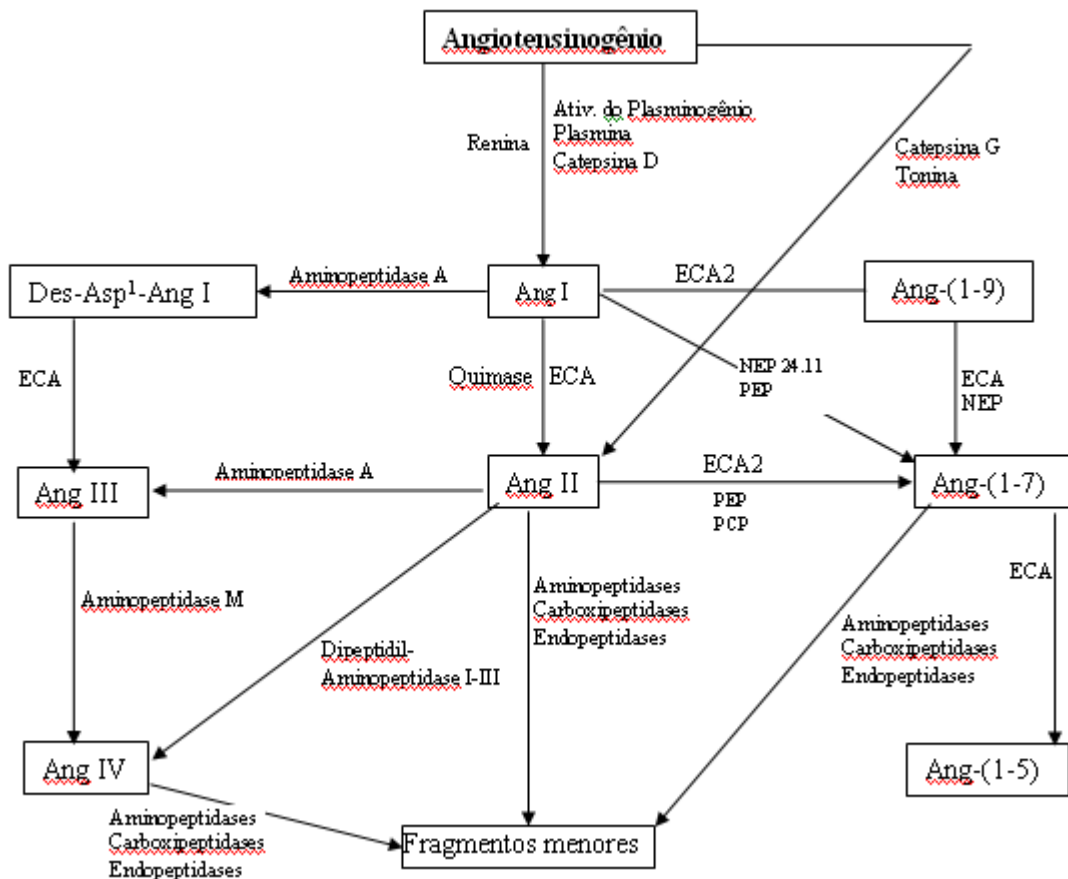
Os principais componentes conhecidos do SRA são: renina, angiotensinogênio, Ang I, ECA e Ang II. A renina é a enzima responsável pela quebra do angiotensinogênio, formando a Ang I. A ECA é a enzima responsável pela clivagem dos dois aminoácidos carboxi-terminais da Ang I formando Ang II, o principal peptídeo do SRA. Os receptores de atuação AT1 e AT2 são os responsáveis pelos seus efeitos da Ang-II. Ainda no SRA temos também Angiotensina III, Angiotensina IV, angiotensina-(1-9), Ang-(1-7), Angiotensina-(1-5), bem como outra enzima conversora de angiotensina, a ECA2 ( ROKS et al, 1999; DONOGHUE et al, 2000; BURRELL et al, 2004) (Figura 1)

Nos últimos anos têm sido apresentadas inúmeras funções da Ang-(1-7), que foi primeiro identificada em cérebro de ratos (BLOCK et al, 1988) e verificada sua origem como um fragmento biologicamente ativo da Ang-II (SANTOS et al., 1988). A Ang-(1-7) também pode ser formado diretamente a partir da Ang-I, por ação da prolil-endopeptidase (PEP) ou da endopeptidase neutra (NEP). A outra via é dependente de ECA2, que dá origem à Angiotensina 1-9 que será clivada pelas enzimas ECA ou NEP formando Ang-(1-7). A Ang-(1-7) pode ser formada a partir da Ang-II por clivagem pelas enzimas prolil-carboxipeptidase (PCP), NEP ou ECA2 ( BURRELL et al, 2004) (Figura 2).

Vários estudos têm mostrado a presença do sistema renina angiotensina no sistema reprodutor. Foi demonstrada a produção de pró-renina e renina por células tecais cultivadas *in vitro* (PAULSON et al., 1989), bem como a expressão de gene da pró-renina em células tecais e luteais em macaco (ITSKOVITZ et al, 1992). A ECA foi identificada em ovários de rata, no

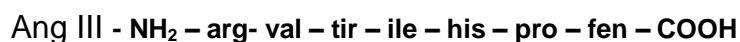
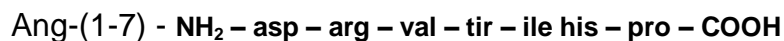
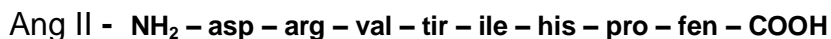
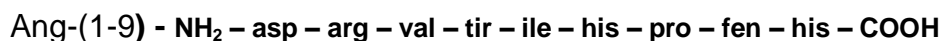
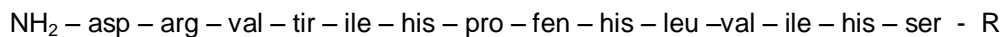
epitélio germinativo próximo ao corpo lúteo, células granulosas de alguns folículos, vasos sanguíneos e estroma (SPETH, HUSAIN, 1988). Foi identificada RNA mensageiro para angiotensinogênio em ovário de rata e sua expressão parece ser estimulada por hormônios (OHKUBO et al., 1986). No ovário, foi encontrada imunorreatividade para Ang-I e Ang-III no fluido folicular humano (LIGHTMAN et al, 1987; FERNANDEZ et al, 1985; CULLER et al.,1986)

Pesquisas recentes realizadas no laboratório de Endocrinologia e Metabolismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais mostraram que a Ang-(1-7) está presente em ovário de rata e que sua concentração varia durante o ciclo estral, sendo as concentrações mais altas observadas no proestro e estro(COSTA et al., 2003). Verificou-se também aumento da produção de estradiol e progesterona em ovários de coelhas perfundidos com Ang-(1-7) (VIANA, 2005). Ang-(1-7) também aumentou a taxa de ovulação em ovários coelhas perfundidas *in vitro* (VIANA , 2005).



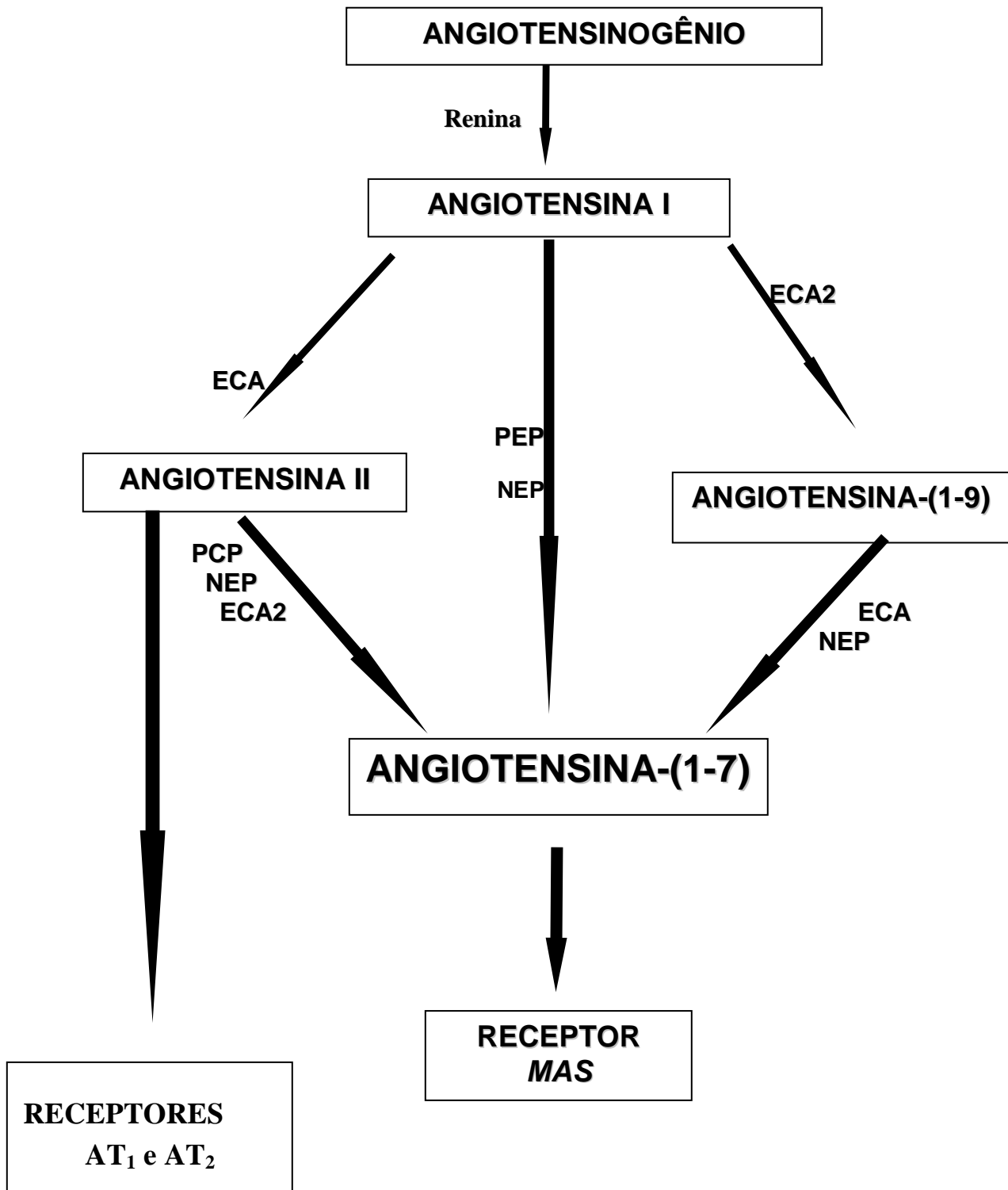
**ESTRUTURA DE ALGUNS PEPTÍDEOS DO SRA**

**Angiotensinogênio**



**Figura 2.** Processo de formação e metabolismo das angiotensinas (Adaptado de COSTA, 2000).





**Figura 1.** Sistema Renina-Angiotensina e seus receptores (Adaptado de BURREL et al., 2004)

## 1.1 Esteroidogênese Testicular

Os testículos dos mamíferos têm duas funções: a produção de andrógenos e de espermatozóides. Os testículos são organizados em dois compartimentos: o compartimento tubular, composto por células germinativas, células mióides, e células de Sertoli, e o compartimento intersticial, formado por células de Leydig, fibras de tecido conjuntivo, além de nervos, vasos sanguíneos e linfáticos (SETCHELL, 1991). Pesquisas têm mostrado as inter-relações entre células de Sertoli e Leydig. Embora as células sejam separadas pela membrana basal, pelas células mióides e pelo espaço intersticial, a comunicação pode ocorrer através da secreção de fatores protéicos produzidos pelas células de Sertoli que agem de modo parácrino sobre as células de Leydig, podendo esses fatores interferir de modo negativo ou positivo na esteroidogênese (SHARPE, 1985; VERHOEVEN, CAILLEAU, 1990).

A produção de andrógeno começa no período fetal, quando é essencial para diferenciação sexual, sob o estímulo de hCG (Gonadotrofina Coriônica Humana). Na puberdade inicia-se a síntese de andrógeno dependente de LH (Hormônio Luteinizante), que é responsável pelo aparecimento de características sexuais secundárias, manutenção da espermatogênese e pelo comportamento sexual (SHARPE, 1984; BRAUSTEIN, 1994).

As células de Leydig são responsáveis pela produção de andrógenos, e são elas que estão em maior quantidade no espaço intersticial. Sendo uma célula produtora de andrógeno, tem como características citoplasmáticas, grande quantidade de retículo endoplasmático liso e mitocôndrias, onde fica alojado o receptor para acoplar moléculas necessárias para esteroidogênese (TEERDS, 1988).

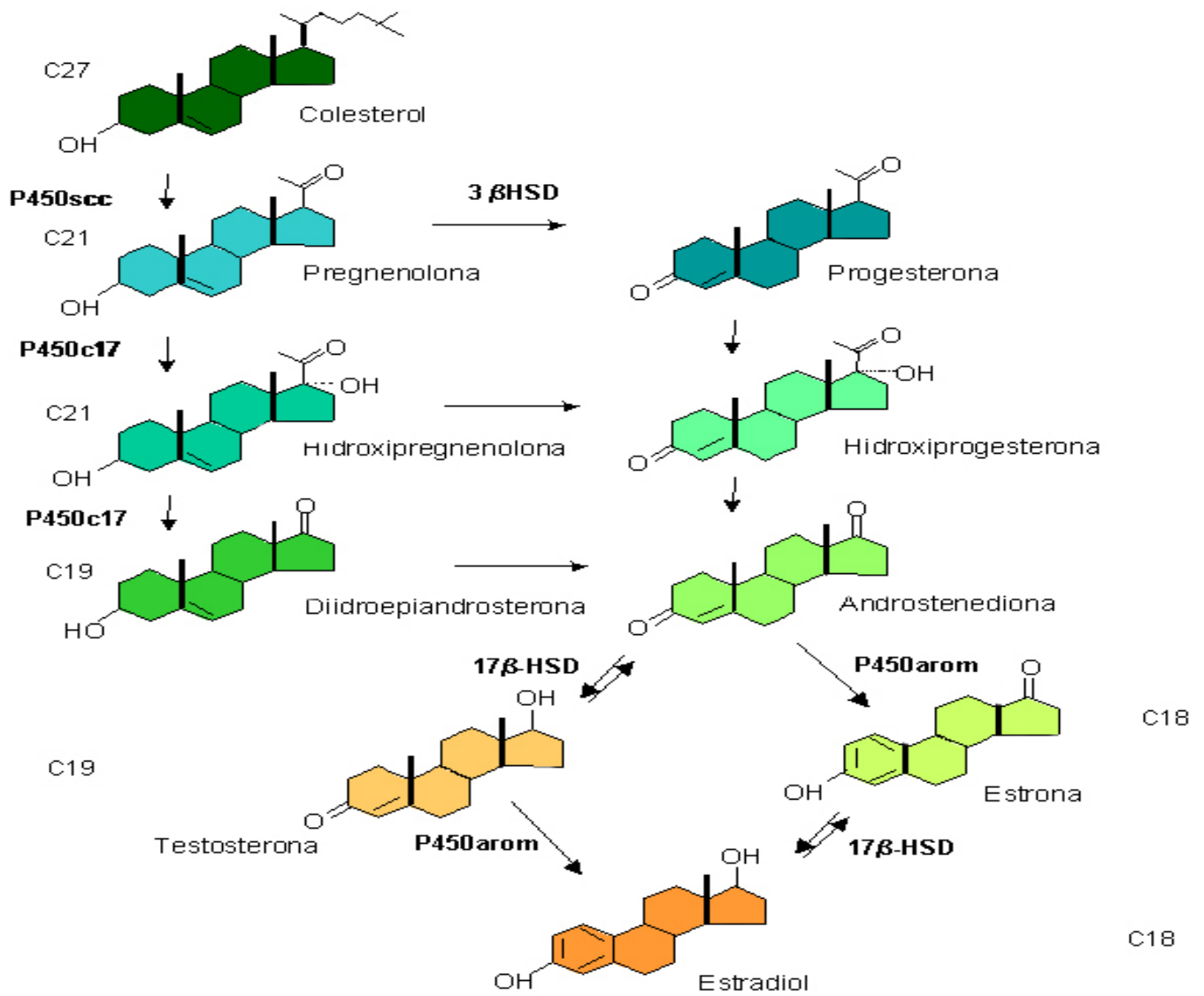
A testosterona é o principal andrógeno secretado pela célula de Leydig a testosterona é a principal. No caso do homem 95% da testosterona plasmática é de origem testicular. No grupo de hormônios androgênicos, também existe a diidrotestosterona (DHT) que é formada pela ação da enzima  $5\alpha$ -redutase sobre a testosterona. A DHT utiliza o mesmo receptor da testosterona, sendo 2,5 vezes mais potente. A formação desses hormônios está sob controle da via eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, onde o GnRH hipotalâmico agindo sobre a hipófise provoca a liberação de LH, que age diretamente sob os receptores específicos das células de Leydig. Os andrógenos são primariamente derivados do depósito de colesterol existente nas gotas lipídicas do citoplasma das células de Leydig, outra fonte do precursor é o colesterol plasmático. No rato o colesterol plasmático contribui com 40% do total necessário para síntese dos andrógenos (MORRIS, CHAIKOFF, 1959; HALL, 1963; FREEMAN, ROMMERTS, 1996; GONZÁLES et al., 2002). As células de Leydig contém receptores para colesterol que reconhecem ambos, HDL (Lipoproteínas de alta densidade) e LDL (Lipoproteínas de baixa densidade) sendo que utilizado preferencialmente no rato HDL (CHEN et al, 1980). Nos mamíferos o passo inicial na biossíntese de andrógenos é a conversão do colesterol em pregnolona. Essa reação ocorre na membrana interna da mitocôndria pela ação da enzima citocromo P450<sub>scc</sub> que realiza a clivagem da cadeia lateral do colesterol, utilizando NADPH como fonte de energia (PARKER, SCHIMMER, 1997).

Os estímulos dos esteróides nas células de Leydig são realizados de duas formas: primeira é a forma aguda que utiliza a síntese de proteína que está relacionado ao transporte de colesterol até a membrana mitocôndria; segunda é a forma crônica que participa do crescimento celular e manutenção de enzimas esteroidogênicas (HALL, 1994).

As células de Leydig têm em sua superfície receptores para LH, que estão acoplados a enzima adenilato-ciclase e quando estimulados, esses receptores promovem o aumento nos níveis

de AMPcíclico intracelular, que parece funcionar como sinalizador para aumentar os níveis de P450<sub>scc</sub> (MARSH, 1976). Algumas evidências têm mostrado que o estímulo dos receptores de LH age sobre a síntese de proteínas que estão envolvidas na regulação da esteroidogênese nas fases iniciais da biossíntese: a SCP2 (Steroid Carrier Protein 2) que participa do transporte do colesterol livre no citoplasma até a membrana externa da mitocôndria, e StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein), que é responsável pelo transporte do colesterol da membrana externa para a membrana interna da mitocôndria, um papel limitante para a regulação aguda da esteroidogênese. A StAR participa do transporte do colesterol no meio aquoso entre duas membranas das mitocôndrias, aumentando o substrato para esta organela (STOCCO, 1996).

Para ocorrer a produção de esteróides, o LH age nos seus receptores que estimulam a formação do segundo mensageiro AMP cíclico, que aumenta os níveis de P450<sub>scc</sub> através da transcrição gênica; ou de forma aguda através da síntese de StAR, que é independente da formação de um novo mRNA (CLARK et al., 1994; MILLER, STRAUSS, 1999). Depois de processada a formação de testosterona, esta se difunde para a superfície celular e posteriormente é liberada no espaço extracelular circundante, de onde é captada pela circulação sanguínea, linfática ou pelos túbulos seminíferos (DEKRETZER, KERR, 1988). O sistema reprodutor masculino pode produzir outros esteróides como diidrotestosterona e estradiol, com funções fisiológicas específicas. A diidrotestosterona é formada pela ação da enzima 5 $\alpha$ -redutase e o estradiol pela citocromo P450 aromatase, dependendo da atividade de cada enzima nos tecidos-alvo (PAYNE, O'SHAUGHNESSY, 1996) ( Figura 3)



**Figura 3.** Vias de metabolismo do colesterol no testículo para formação de testosterona. (Adaptado de VAN VOORHIS, 1999)

## **1.2 Sistema Renina Angiotensina no Sistema Reprodutor Masculino**

### **1.2.1 Angiotensinogênio**

Alguns componentes do sistema SRA já foram identificados no testículo, como o, angiotensinogênio, ECA e renina. As concentrações de mRNA para angiotensinogênio nos testículos é baixa em ratos e alta em camundongos (SPETH, DAUBERT, GROVE, 1999). O angiotensinogênio foi também encontrado nas células do epidídimo, sugerindo a formação intracelular de Ang I (CUSHMAN; CHEUNG,1971). Foi também observado em ratos, que as maiores concentrações de Ang I e Ang II encontram-se no líquido seminal (WONG; UCHENDU, 1991).

### **1.2.2 Renina**

A presença da renina e do seu mRNA foram relatadas nas células de Leydig dos testículos de ratos e camundongos (PANDEY, INAGAMI, 1984; 1986; DESCHEPPE et al., 1986). A renina é um peptídeo que inicia sua atividade na puberdade e mostra ter uma correlação direta com os níveis plasmáticos de gonadotrofinas (PARMENTIER et al., 1983). A expressão da renina também foi demonstrada no epidídimo (WONG; UCHENDU, 1991), onde é secretada de forma andrógeno dependente (UCHENDU, 1995).

### **1.2.3 Enzima Conversora de Angiotensina**

A enzima conversora de angiotensina testicular (ECA<sub>t</sub>) é encontrada nas células da linhagem germinativa pós-meióticas e nos espermatozóides (SPETH et al, 1999). Pesquisas recentes identificaram em mamíferos uma enzima análoga à ECA, também chamada de homólogo humano da ECA e conhecida como ECA2. A atividade dessa metaloenzima foi também descrita no coração (ZISMAN et al, 2003) rins (CHAPPELL et al, 2001) e células germinativas testiculares (HARMER, 2002; ALENINA et al, 2002), e tem relação com a produção de angiotensina-(1-7).

Pesquisas feitas no sistema reprodutor, mais especificamente no epidídimo de ratos, demonstraram altas concentrações de ECA ativa se comparada a outros órgãos (CUSHMAN; CHEUG, 1971). A concentração de ECA também aumentou após a puberdade e sofre um aumento transitório durante períodos de estímulos sexuais em ratos, podendo estar relacionada positivamente com a produção de esperma (HOHLBREGGER et al, 1982).

### **Tópico de ANGIO**

#### **1.2.4 Receptores para Ang II**

Alguns trabalhos verificaram a expressão do mRNA para receptor AT1 e AT2 em testículos de ratos (KITAMI et al., 1992; MILLAN, AGUILERA, 1988; AGUILERA et al, 1989). No caso do rato, o receptor encontrado foi do tipo AT1 com a presença de seus dois subtipos AT1a e AT1b (KITAMI et al, 1992). As pesquisas sugerem que a estimulação do receptor AT1 nas células de Leydig inibe a capacidade das gonodotrofinas de estimularem a

produção de testosterona e o mecanismo seria a inibição da via do AMP cíclico (KHANUM, DUFAU, 1988).

A presença dos receptores para Ang II foi verificada também no epidídimo de rato e suas concentrações podem variar conforme a faixa etária (LEUNG et al, 1997).

### **1.2.5 Ang-(1-7) e Recetor MAS**

A localização e distribuição do RNAm para o protooncogene MAS foi estudado por hibridização com probes de cRNA marcado, em cérebro de rato e foi observada sua presença em várias áreas cerebrais (BUNNEMANN et al, 1990). A expressão do proto-ocogene MAS foi também descrita em testículos de ratos (METZER et al, 1995). O proto-oncogene MAS tem sua expressão em camundongos somente a partir dos 18 dias de idade e aumenta até o sexto mês (ALENINA et al., 2002). Pesquisas mais recentes mostraram pela primeira vez um receptor funcional para Ang-(1-7), o receptor MAS, localizado em rim de camundongo (SANTOS et al, 2003). A localização do receptor MAS foi também determinada por imuno-histoquímica em ovários de ratas nas várias fases do ciclo estral (PEREIRA et al, 2004). Em testículos de camundongos e ratos, o MAS só apareceu várias semanas após o nascimento coincidindo com a puberdade (ALENINA et al, 2002). Em camundongos com 3 meses de idade que o receptor MAS é expresso e localizado em células de Leydig e Sertoli, com maior quantidade nas células de Leydig (ALENINA et al, 2002).

Apesar da observação de que um grupo camundongos knockout para receptor MAS não teve alterações na saúde e fertilidade (WALTHER et al, 1998), o fato de o receptor MAS se apresentar no testículo na fase da puberdade, estar presente em maior quantidade nas células de Leydig, responsáveis pela produção de testosterona, que começa sua produção no início da puberdade,



leva-nos a suspeitar de que esse receptor e o peptídeo Ang-(1-7) podem ter uma participação na produção de testosterona e na reprodução.

Pesquisas preliminares realizadas para verificar o efeito do Ang-(1-7) sobre esteriodogênese testicular, utilizaram como modelo o sistema de perfusão do órgão isolado ou sistema de incubação com o peptídeo. No modelo de perfusão com testículos de ratos, foi observado aumento da testosterona no perfusato (VIANA et al, 2003), enquanto que no modelo de incubação de testículos humanos, a Ang-(1-7) diminuiu a produção de testosterona (REIS, 2006). Apesar dos resultados *in vitro*, não foi ainda verificado o efeito desse peptídeo sistêmico na esteriodogênese, exposto à interferência do metabolismo do organismo. Para essa verificação, o peptídeo foi incluído no polissacarídeo ciclodextrina que tem a capacidade de acoplar-se à Ang-(1-7), tornando essa molécula protegida das enzimas digestivas, podendo ser administrada via oral. Assim, tornou-se possível verificar o seu efeito nos órgãos reprodutores, a partir do plasma.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.2 Objetivo geral**

Verificar a expressão da Ang-(1-7) no testículo de camundongos e seu efeito sobre a esteroidogênese.

### **2.3 Objetivos específicos**

- Verificar a expressão e localização da Ang-(1-7) no testículo de camundongos através de imuno-histoquímica;
- Verificar o efeito da Ang-(1-7) via oral sobre os níveis de testosterona plasmática;

- Avaliar o efeito tratamento oral da Ang-(1-7) na síntese de testosterona em testículos incubados *in vitro*, e sobre o peso corporal e pesos da próstata, da vesícula seminal e do tecido adiposo epididimal.

### 3 - Capítulo

#### Presença da angiotensina-(1-7) no testículo de camundongo e efeitos sobre a esteroidogênese e tecido adiposo epididimal

*Presence of angiotensin-(1-7) in the mouse testis of mouse and effects on steroidogenesis and epididimal adipose tissue*

Alécio Matos *Pereira*<sup>1</sup>; Kinulpe *Honorato-Sampaio*<sup>2</sup>; Gregório Elias Nunes *Viana*<sup>4</sup>; Robson Augusto de Sousa Santos<sup>3</sup>, Adelina Martha dos Reis<sup>3</sup>; Amilton Paulo Raposo *Costa*<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Mestrando em Ciência Animal – CCA – UFPI

<sup>2</sup> Doutorando em Ciência Biológicas – ICB – UFMG

<sup>3</sup> Departamento Fisiologia e Biofísica, ICB, UFMG

<sup>3\*4</sup> Departamento Morfofisiologia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, UFPI

Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí.

Campus da Socopo, 64046-550 Teresina-PI

#### RESUMO

A angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] é um membro biologicamente ativo do sistema renina-angiotensina e trabalhos recentes mostram sua participação na fisiologia reprodutiva. O objetivo do presente estudo foi verificar a presença da Ang-(1-7) em testículo de camundongos e seu

25 efeito sobre a esteroidogênese após administração oral. Oito camundongos/grupo foram tratados  
26 diariamente por gavagem, durante 14 dias com água, com ciclodextrina, Ang-(1-7) acoplada à  
27 ciclodextrina, e com seu antagonista A779 acompanhado ou não com Ang-(1-7). Após  
28 tratamento, os animais foram sacrificados, o plasma coletado para dosagem de testosterona por  
29 RIE, e os testículos incubados em meio de cultivo por 4 h. Foram também determinados os pesos  
30 da próstata, vesículas seminais, tecido adiposo epididimal e peso corporal. Testículos de  
31 camundongos não tratados foram processados para imunohistoquímica pelo método da avidina-  
32 biotina-peroxidase, observando a presença da Ang-(1-7) nas células de Leydig e em algumas  
33 células germinativas. As dosagens de testosterona no plasma e no meio de incubação mostraram  
34 grande variabilidade, indicando que esse modelo não é adequado para avaliação dos efeitos da  
35 Ang-(1-7) sobre a esteroidogênese. Os pesos dos testículos, vesículas seminais, próstata e peso  
36 corporal não apresentaram diferença significativa. O tecido adiposo epididimal aumentou após  
37 tratamento com Ang-(1-7) e diminuiu com A779, sugerindo a participação desse peptídeo na  
38 fisiologia do tecido adiposo.

39 **Palavras-chave:** sistema renina-angiotensina, Angiotensina-(1-7), testículo .  
40

#### 41 **ABSTRACT**

42  
43  
44 Some components of the rennin-angiotensin system (RAS) have been reported in the  
45 reproductive system. Studies have been shown the presence of Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)], an  
46 important biologically active component of the SRA, and its receptor MAS, in Leydig cells.  
47 Therefore the aim of the present study was to verify the presence and localization of Ang-(1-7) in  
48 mice testes, and its effect on steroidogenesis after oral treatment. Eight mouse/group were daily

49 submitted to oral treatment by gavage, once to day, during 14 days according to the following  
50 treatments: water, ciclodextrine (61µg/Kg), Ang-(1-7) (100 µg/kg) coupled to ciclodextrin, A779  
51 (100 µg/kg) and Ang-(1-7) with A779. After the treatments, the animals were sacrificed, the  
52 blood was collected for testosterone dosage and the testes were removed and incubate *in vitro*.  
53 Body weight, prostate, seminal vesicle and epididimal adipose tissue weights were measured for  
54 each mice. Testes from untreated mice were submitted to immunohistochemistry by avidine-  
55 biotine-peroxide method, showing Ang-(1-7) presence in Leydig cells and some germ cells.  
56 Testosterone levels in plasma and in medium after incubation showed a great variation. No  
57 significant difference in body weight and testes, seminal vesicles and prostate weights was  
58 observed. Epididimal adipose tissue weight increased after Ang-(1-7) treatment and decreased  
59 after A-779 treatment. In conclusion, the testes incubation *in vitro* were not appropriated to  
60 evaluate the steroidogenic effect of oral Ang-(1-7) treatment, Ang-(1-7) is present in the testes,  
61 specifically in the cells of Leydig, and oral Ang-(1-7) treatment might alter the adipose tissue  
62 weight.

63

64

65 **Keywords:** renin-angiotensin system, angiotensin-(1-7), Testis.

66

67

68

69

70

71

72

### 73 3. INTRODUÇÃO

74

75 O sistema renina-angiotensina (SRA) clássico é bem conhecido por seu papel como  
76 regulador da homeostase hidroeletrolítica e da pressão arterial (SANTOS et al, 2000a; SANTOS  
77 et al, 2000b). A influência do SRA sobre as funções orgânicas envolve múltiplos mediadores,  
78 receptores e mecanismos de sinalização intracelular (ARDAILLOU, 1999; SANTOS et al.,  
79 2000b; KIM & IWAO, 2001). Os principais componentes do SRA são: angiotensinogênio,  
80 renina, angiotensina I (Ang I), enzima conversora de angiotensina (ECA) e angiotensina II (Ang  
81 II). A renina é a enzima responsável pela quebra do angiotensinogênio, formando a Ang I,  
82 enquanto a ECA cliva dois aminoácidos carboxi-terminais da Ang I formando o octapeptídeo  
83 Ang II, o principal peptídeo biologicamente ativo do SRA. A Ang II atua sobre os receptores AT<sub>1</sub>  
84 e AT<sub>2</sub>, que são responsáveis pelos seus efeitos. Outros peptídeos do SRA são a angiotensina III,  
85 angiotensina IV, angiotensina-(1-9) [Ang-(1-9)], angiotensina-(1-5), enzima conversora de  
86 angiotensina 2 (ECA2) e a Ang-(1-7) (ROKS et al, 1999; DONOGHUE et al., 2000; BURRELL  
87 et al., 2004). A Ang-(1-7) atua sobre receptor MAS, que faz parte da família de receptores com  
88 sete domínios transmembranas acoplados à proteína G, assim como os receptores de Ang II  
89 (SANTOS et al, 2003).

90 Nos últimos anos, têm sido apresentadas inúmeras funções para a Ang-(1-7), que foi  
91 primeiramente identificada em cérebro de ratos (BLOCK et al., 1988) e verificada como um  
92 fragmento biologicamente ativo da Ang II (SANTOS et al., 1988). A Ang-(1-7) é formada a  
93 partir da clivagem de um aminoácido carboxi-terminal da Ang II pela prolil-endopeptidase (PEP)  
94 ou pela endopeptidase neutra (NEP) ou prolil-carboxipeptidase (PCP). A Ang-(1-7) pode também  
95 ser formada por via independente de ECA, onde a Ang I é clivada em Ang-(1-9) pela ECA2, que

96 por sua vez pode ser clivado pela NEP ou ECA. Em outra via independente de ECA, a Ang-(1-7)  
97 pode ser formado diretamente da Ang I pela ação da PEP ou NEP (BURREL et al., 2004).

98 Componentes do SRA já foram demonstrados em vários tecidos e órgãos tais como  
99 coração, cérebro, rins, tecido adiposo e pâncreas, desempenhando, provavelmente, papéis  
100 parácrinos e/ou autócrinos (LAVOIE, SIGMUND, 2003; PAUL et al., 2006). Os componentes  
101 do SRA também já foram descritos no trato reprodutor feminino e masculino, indicando a  
102 participação desse sistema em processos fisiológicos tais como, desenvolvimento folicular,  
103 maturação ovocitária, atresia, esteroidogênese e gametogênese (KHANUM, DUFAU, 1988;  
104 SPETH et al., 1999; YOSHIMURA, 1997; PAUL et al., 2006).

105 Dados recentes têm destacado a participação da Ang-(1-7) como um dos peptídeos  
106 biologicamente ativo do SRA no trato reprodutor. Resultados pioneiros com esse peptídeo  
107 mostraram que a Ang-(1-7) está presente em ovário de rata, com concentrações mais altas no  
108 proestro e estro, e que o tratamento de ovários de ratas perfundidos *in vitro* com Ang-(1-7)  
109 aumenta a esteroidogênese (COSTA et al., 2003). Já em ovários de coelhas perfundidos *in vitro*  
110 apresentaram diminuição na taxa ovulatória estimulada por hCG após tratamento com A779, um  
111 antagonista específico da Ang-(1-7) (VIANA, 2005). A expressão do receptor MAS foi  
112 observada em testículos de ratos (METZER et al, 1995) e em ovários de ratas nas várias fases do  
113 ciclo estral (PEREIRA, 2004). Em testículos de camundongo, a expressão do receptor MAS  
114 ocorreu somente a partir dos 18 dias de idade, aumentando até o sexto mês, sendo expresso nas  
115 células de Leydig e Sertoli (ALENINA et al., 2002). Camundongos *knockout* para receptor MAS  
116 apesar de não apresentarem alterações na saúde (WALTHER et al, 1998), mostraram uma  
117 diminuição na produção espermática diária sem comprometimento significativo da fertilidade  
118 (PINHEIRO, 2004). A expressão gênica testicular nesses mesmos animais também estava

119 alterada, sendo observada diminuição na expressão de RNAm da StAR (*Steroid Acute Regulatory*  
120 *Protein*) e 3 $\beta$ -HSD1 (*3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1*) e aumento da 3 $\beta$ -HSD6 (XU et al.,  
121 2007). A StAR é a proteína responsável pelo transporte do colesterol da membrana externa para a  
122 membrana interna da mitocôndria, local onde ocorre a clivagem da cadeia lateral do colesterol  
123 pela citocromo P450scc, enquanto as 3 $\beta$ -HSD6 são enzimas chaves para a síntese de testosterona  
124 pelas células de Leydig (BAKER et al., 1999). Com isso, esses trabalhos indicam a possível  
125 participação da Ang-(1-7) na produção de testosterona e na fisiologia reprodutiva dos machos.

126 Pesquisas realizadas para verificar o efeito de diversas substâncias sobre a  
127 esteroidogênese testicular utilizam como modelo o sistema de perfusão do órgão isolado ou  
128 sistema de incubação com a substância em estudo. No modelo de perfusão com testículos de  
129 ratos, foi observado que o tratamento com Ang-(1-7) aumentou a testosterona no perfusato  
130 (VIANA et al, 2003), enquanto que no modelo de incubação de testículos humanos, a Ang-(1-7)  
131 diminuiu a produção de testosterona (REIS, 2006). Apesar desses resultados indicarem a  
132 participação da Ang-(1-7) na esteroidogênese testicular *in vitro*, não foram realizados  
133 experimentos para averiguar o efeito sistêmico desse peptídeo sobre a esteroidogênese. Para essa  
134 verificação, a Ang-(1-7) foi incluída no polissacarídeo ciclodextrina, tornando-a protegida de  
135 enzimas digestivas, além de permitir sua administração por via oral (LULA et al., 2007). Assim,  
136 é possível verificar o efeito sistêmico da Ang-(1-7) em diferentes tecidos. Com isso, o presente  
137 estudo teve o objetivo de verificar a presença e localização da Ang-(1-7) em testículo de  
138 camundongos e o efeito desse peptídeo, após administração oral, sobre a esteroidogênese  
139 testicular e sobre o peso de tecidos que estão sob influência de esteróides sexuais.

140

141



## 142 **4 MATERIAL E MÉTODOS**

143

### 144 **4.1 Animais**

145 Foram utilizados camundongos machos *C57 Black 6*, pesando 28-35 g, com 4 meses de  
146 idade, criados no Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo  
147 Horizonte, MG, Brasil, de acordo com as normas Internacionais para manuseio Animais. Foram  
148 mantidos 5-8 animais por caixa, com ciclo 14h claro: 10h escuro, temperatura  $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , ração e  
149 água *ad libidum*.

150

### 151 **4.2 Protocolo Experimental**

152 Para averiguar os efeitos da Ang-(1-7) sobre a síntese de testosterona em testículos de  
153 camundongos incubados *in vitro*, oito animais/grupo receberam diariamente por gavagem, uma  
154 vez ao dia, durante 14 dias, os seguintes tratamentos: água, ciclodextrina (61  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ), Ang-(1-7)  
155 (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), A-779 (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), e Ang-(1-7) A-779 (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Tanto a Ang-(1-7) quanto o A-  
156 779 foram acoplados à ciclodextrina, visando sua proteção contra degradação enzimática. Após o  
157 último dia de tratamento, os animais foram anestesiados com tiopental sódico 30  $\text{mg}/\text{Kg}$   
158 (Tiopental, Cristália-Brasil), os testículos foram retirados e mantidos, sob refrigeração, no meio  
159 de incubação, composto de Meio 199 (Sigma) com sais de Earle e L-glutamina (Sigma Chemical  
160 Co, USA), suplementado com 1% de albumina sérica bovina (BSA) e Hepes (0,4 $\text{mg}/\text{mL}$ ), pH  
161 7,4.

162 Em seguida, todos testículos foram cortados para exposição do parênquima e incubados  
163 separadamente em 2 mL do meio descrito acima, à  $35^{\circ}\text{C}$  e atmosfera de 95%  $\text{O}_2$  e 5 % de  $\text{CO}_2$ ,  
164 durante quatro horas. Após uma e quatro horas de incubação, foram coletados 100 $\mu\text{l}$  de meio para

165 dosagem de testosterona, sendo repostado o mesmo volume de meio. O meio coletado foi  
166 imediatamente congelado e mantido à -20°C para posterior dosagem hormonal por  
167 radiomunoensaio.

168 Para averiguar os efeitos da Ang-(1-7) sobre os níveis de testosterona plasmática, o  
169 sangue de cada animal foi coletado em tubos heparinizados e centrifugado à 4°C com 2.500 rpm,  
170 durante 15 minutos. O plasma foi separado e congelado -20°C para posterior dosagem hormonal.  
171 Foram mensurados também o peso corporal, e os pesos da próstata, da vesícula seminal e do  
172 tecido adiposo epididimal. Os valores dos pesos foram corrigidos para cada 10 g de peso  
173 corporal.

174

#### 175 **4.3 Preparo de tecidos para imunohistoquímica**

176 Quatro animais não submetidos aos tratamentos descritos anteriormente foram receberam  
177 injeção intraperitoneal de sulfato de heparina (500 UI/animal) (Liquemine – Roche-Brasil) e  
178 posteriormente anestesiados conforme descrito no experimento anterior. Foi realizada a  
179 laparotomia e toracotomia, e procedida a perfusão dos órgãos através do ventrículo esquerdo com  
180 tampão fosfatasalina (PBS) 0,05M, até a clarificação total dos rins e do fígado. Logo após, os  
181 animais foram perfundidos com inibidores de peptidases (fenil-metilsulfonil fluoreto  $10^{-5}$ M,  
182 Pepstatina-A  $0,5 \times 10^{-5}$ M e EDTA a  $10^{-5}$ M, todos adquiridos da Sigma-Aldrich Corp., USA) em  
183 ácido acético 0,1M, seguido de perfusão com paraformaldeído 4% em tampão fosfato a 0,2M, pH  
184 7,4. Os testículos foram mantidos na solução de paraformaldeído à 4°C por 48h, incluídos em  
185 parafina, seccionados com 4µm e os cortes montados em lâminas gelatinizadas.

186

187

188

#### 189 **4.4 Imuno-histoquímica**

190 A imuno-histoquímica foi realizada pelo método da avidina-biotina peroxidase com o Kit  
191 Vectastain Universal (Vector laboratories, EUA). Os cortes foram desparafinizados com xilol e  
192 reidratados em uma seqüência gradual de álcoois, até água destilada. O bloqueio de peroxidase  
193 endógena foi realizado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% em metanol durante 30 minutos, seguido pelo bloqueio de  
194 sítios inespecíficos com soro normal de cavalo 4% durante 30 min, ambos à temperatura  
195 ambiente. Os cortes foram incubados com anticorpo policlonal de coelho Anti-Ang-(1-7)  
196 (1:2000), durante aproximadamente 16-18 h à 4°C. Em seguida, foi realizada incubação durante  
197 30 min com anticorpo secundário biotilado anti-IgG Universal (1:200) produzido em cavalo, e  
198 incubação com complexo avidina-biotina peroxidase durante 1 hora, ambas à temperatura  
199 ambiente. A visualização da marcação foi realizada com 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma-  
200 Aldrich Corp., USA) em PBS 0,05M contendo 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e contra-coloração com hematoxilina.  
201 Os controles negativos foram realizados abstendo-se do anticorpo primário durante todo o  
202 processo. Os cortes foram desidratados, clarificados em xilol e montados com Entelan.

203

#### 204 **4.5 Radioimunoensaio**

205 As amostras de plasma e do meio de incubação foram submetidas à dosagem de  
206 testosterona por radioimunoensaio com o *kit* comercial *Testosterone Maiar* (Adaltis Itália S.p.A),  
207 de acordo com o fabricante.

208

209

210

211

#### 212 **4.6 Análise estatística**

213 Os dados foram representados como média  $\pm$  erro-padrão da média, sendo submetidos ao  
214 teste de normalidade de Duncan, seguidos da análise de variância (ANOVA) e teste de Student-  
215 Newman-Keuls, todos com nível de significância  $p < 0,05$ .

216

### 217 **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

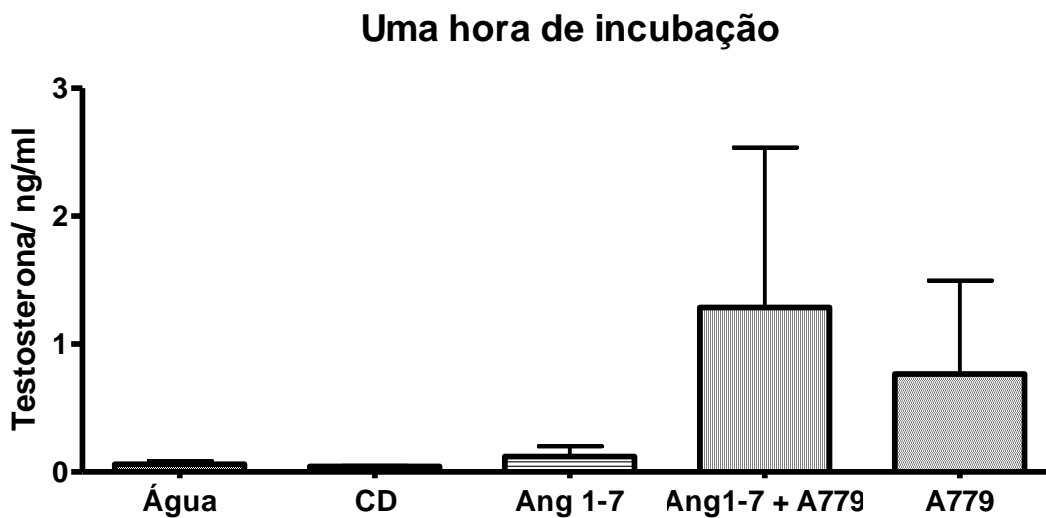
218

#### 219 **5.1 Efeito da Ang-(-1-7) sobre a liberação de testosterona**

220 Os resultados da incubação *in vitro* de testículos de camundongos, previamente tratados  
221 por gavagem, durante 14 dias com água, ciclodextrina, Ang-(1-7) e/ou A-779 mostraram que a  
222 Ang-(1-7) não influenciou significativamente a concentração de testosterona no líquido de  
223 incubação, como mostram as Figuras 1 e 2. Observa-se através dos erros-padrão que os dados  
224 dentro dos mesmos grupos são bastante variáveis. Por isso, apesar de alguns grupos apresentarem  
225 médias elevadas, não houve diferença significativa entre os mesmos. Provavelmente, o modelo  
226 experimental utilizado não seja adequado para investigação proposta. Sugere-se, portanto, a  
227 utilização do modelo de perfusão *in vitro* para futuras investigações.

228 Os dados da dosagem de testosterona plasmática também apresentaram um alto nível de  
229 variabilidade, não sendo observada diferença significativa entre os grupos (Fig. 3). Uma possível  
230 explicação para esse fato, é a secreção pulsátil de testosterona, assim como a variação circadiana.  
231 Além disso, é importante ressaltar que os animais de cada grupo foram mantidos numa mesma  
232 caixa e que é comum entre os roedores o estabelecimento de dominância social entre machos,  
233 fazendo com que os animais dominantes apresentem maior concentração de testosterona

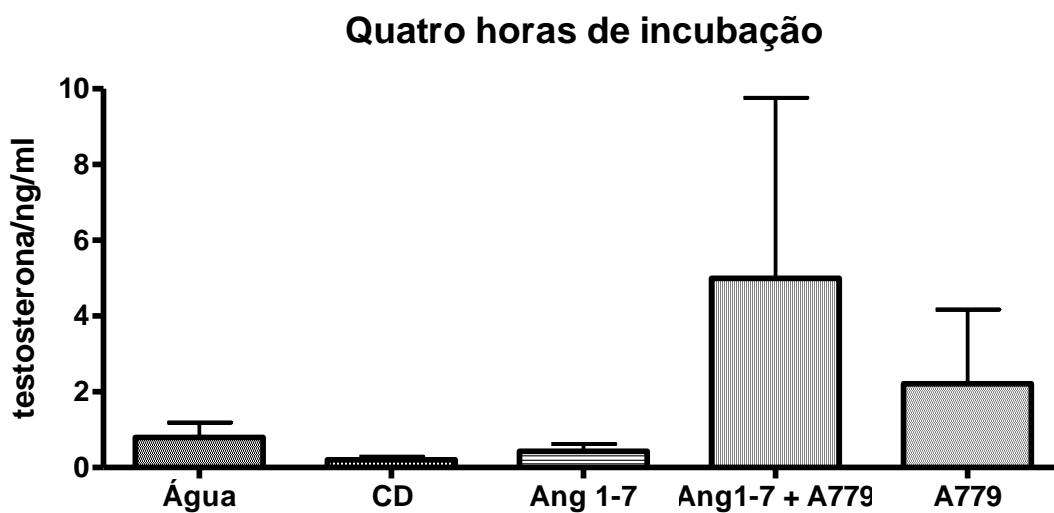
234 plasmática (RUIZ-DE-LA-TORR, MANTECA, 1999; HARDY et al., 2002) e conseqüentemente  
235 maior variabilidade dentro de um mesmo grupo. Uma alternativa para avaliar o efeito de diversas  
236 substâncias sobre a esteroidogênese de camundongos machos seria mantê-los em caixas  
237 separadas durante o tratamento.  
238



239

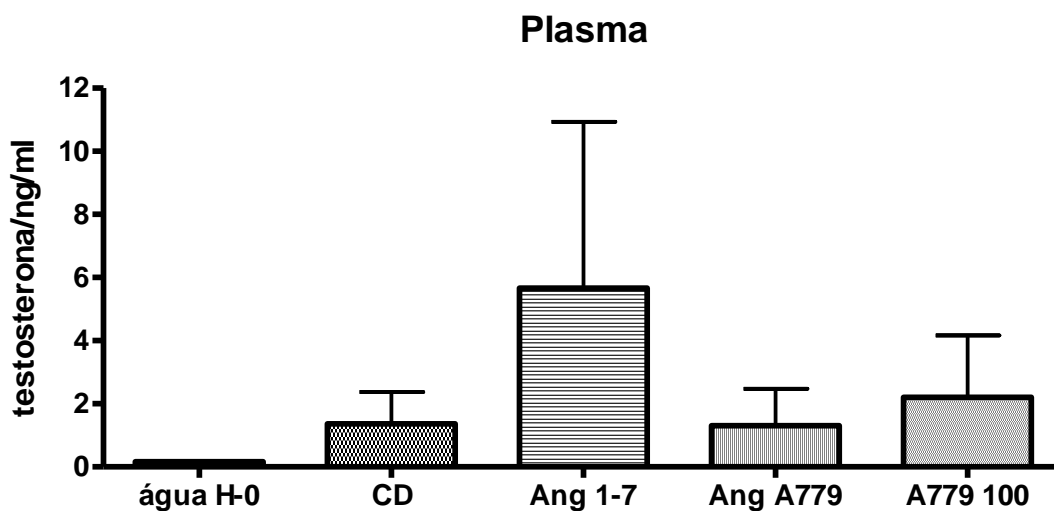
240 **Figura 1.** Concentração de testosterona no meio com testículos de camundongos submetidos a  
241 diferentes tratamentos via oral (n = 8/grupo) após 1 h de cultivo. Tratamentos: Água,  
242 Ciclodextrina (CD), Ang-(1-7), Ang-(1-7) + A779 e A779.

243



244

245 **Figura 2.** Concentração de testosterona no meio com testículos de camundongos submetidos a  
 246 diferentes tratamentos via oral (n = 8/grupo) após 4 h de cultivo. Tratamentos: Água,  
 247 Ciclodextrina (CD), Ang-(1-7), Ang-(1-7) + A779 e A779.



248

249 **Figura 3.** Concentração de testosterona plasmática de camundongos submetidos a diferentes  
 250 tratamentos via oral (n = 8/grupo). Tratamentos: Água, Ciclodextrina (CD), Ang-(1-7), Ang-(1-  
 251 7) + A779 e A779.

252

## 253 5.2 Resposta dos tecidos aos diferentes tratamentos

254 Quando foram comparados os tratamentos em relação aos pesos dos testículo, vesículas  
255 seminais, próstata e ainda ao peso corporal (PC), não foi observado diferença estatisticamente  
256 significativa. (Tabela . I), demonstrando que a Ang-(1-7), assim como o antagonista A-779 não  
257 alteram o peso desses órgãos nem o peso corporal. Porém, quando se compara o peso do tecido  
258 adiposo epididimal entre os grupos, observa-se que o grupo tratado com Ang-(1-7) apresentou  
259 peso significativamente superior ao do grupo que recebeu Ang-(1-7) associado ao antagonista A-  
260 779. Conclui-se então que a adição do antagonista reduziu o peso do tecido adiposo epididimal.  
261 De modo semelhante, o grupo tratado apenas com o antagonista teve redução do tecido adiposo  
262 epididimal em relação ao grupo tratado com Ang-(1-7). Isso mostra que a Ang-(1-7) tende a  
263 aumentar o peso do tecido adiposo epididimal, visto que quando o A-779 ao bloquear o efeito da  
264 Ang-(1-7) exógena e também da endógena provoca uma redução significativa do peso da gordura  
265 epididimal.

266

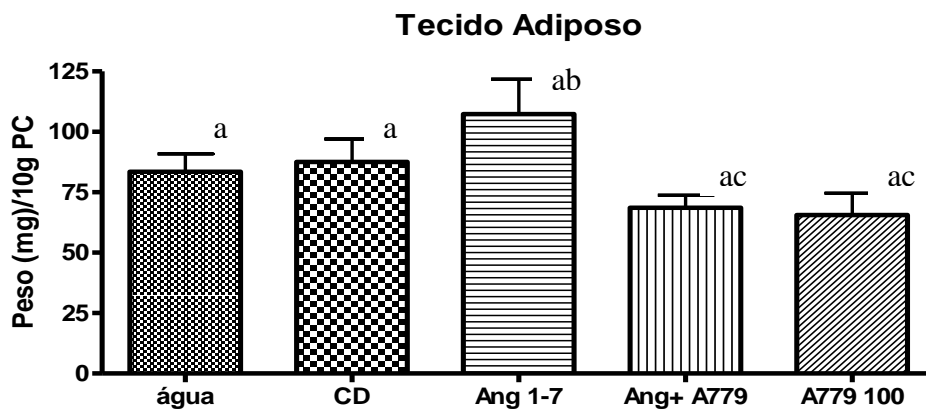
267

268 **Tabela I:** Média  $\pm$  erro-padrão do peso corporal (PC) e pesos dos testículos (T), tecido adiposo  
269 epididimal (TA), próstata (P) e vesícula seminal (VS) após diferentes tratamentos por gavagem  
270 durante 14 dias consecutivos. Os pesos dos tecidos foram corrigidos por 10g

Tratamentos	PC	T	TA	P	VS
água	30,6 $\pm$ 0,4a	73,5 $\pm$ 1.3a	83,4 $\pm$ 7,4a	6,5 $\pm$ 0,4a	54,5 $\pm$ 4,6a
Ciclodextrina	31,3 $\pm$ 1,1a	70,5 $\pm$ 2.1a	87,5 $\pm$ 9,4a	6,1 $\pm$ 0,7a	54,9 $\pm$ 4,3a
Ang-(1-7)	30,7 $\pm$ 0,6a	71,6 $\pm$ 1.5a	107,2 $\pm$ 14,4 ab	5,8 $\pm$ 0,7a	57,6 $\pm$ 4,3a
Ang + A779	31,7 $\pm$ 0,4a	72,6 $\pm$ 2.4a	68,6 $\pm$ 5,1ac	5,9 $\pm$ 0,5a	58,6 $\pm$ 2,3a
A779(100 ug)	32,0 $\pm$ 0,4a	70,3 $\pm$ 1,8a	65,5 $\pm$ 9,1ac	5,5 $\pm$ 0,2a	56,0 $\pm$ 1,1a

271 Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias dos diferentes  
272 tratamentos.

273



275

276

277 **Figura 4.** Peso do tecido adiposo de camundongos (n=8) submetidos a diferentes tratamentos via  
 278 oral. letras: diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

279 Diferentes componentes do SRA já foram descritos no tecido adiposo (ENGELI et al.,  
 280 2003). O angiotensinogênio, precursor dos peptídeos do SRA, tem sua expressão aumentada  
 281 durante a diferenciação do tecido adiposo (STRAZZULLO, GALLETTI, 2004; SCHLING et al.,  
 282 1999). Em humanos, a expressão do angiotensinogênio é maior no tecido adiposo visceral do que  
 283 no subcutâneo (DUSSERE et al., 2000; GIACCHETTI et al., 2002), havendo também um  
 284 aumento de sua expressão em obesos (GIACCHETTI et al., 2002; RANKINEN et al., 1999).  
 285 Portanto, existe uma íntima relação entre o SRA e tecido adiposo. Outro ponto importante para  
 286 ressaltar é que o tecido adiposo epididimal, que apresentou resposta aos diferentes tratamentos do  
 287 presente estudo, é um tipo de tecido adiposo visceral, onde é encontrado maior número de  
 288 receptores para Ang II (FALOIA et al., 2002).

289 A prostaglandina I<sub>2</sub> (prostaciclina) é considerada um poderoso agente adipogênico  
 290 autócrino (NEGREL, 1999) e já foi demonstrado que a Angiotensina II estimula a produção de  
 291 prostaglandina I<sub>2</sub> *in vivo* e *in vitro* em ratos (DARIMONT et al., 1994a; DARIMONT et al.,



292 1994b) e em camundongos, porém nestes não ficou claro se através do receptor AT<sub>1</sub> ou AT<sub>2</sub>  
293 (JONES et al., 1997; DARIMONT et al, 1994a; DARIMONT et al., 1994b). Também foi  
294 demonstrado que a Ang-(1-7) estimula a liberação de prostaglandinas em vaso deferente isolado  
295 de coelho (TRACHTE et al, 1990). Resultados também sugerem que a Ang-(1-7) produz efeitos  
296 vasculares em coração isolado através da interação do seu receptor Mas com os receptores AT<sub>1</sub> e  
297 AT<sub>2</sub>, culminando na liberação de prostaglandinas e óxido nítrico (CASTRO et al, 2005). Com  
298 isso, os resultados relatados em outros trabalhos e os dados obtidos no presente estudo sugerem  
299 que Ang-(1-7) aumente o tecido adiposo epididimal atuando diretamente em seu receptor, ou  
300 através da interação entre os receptores de Ang II (AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>) com o receptor MAS. O presente  
301 estudo abre mais um campo de pesquisa já que mais estudos serão necessários para elucidar os  
302 mecanismos de ação da Ang-(1-7) sobre o tecido adiposo, e sua possível relação com a síndromes  
303 metabólicas.

304

305

306

307

308

309

310

311

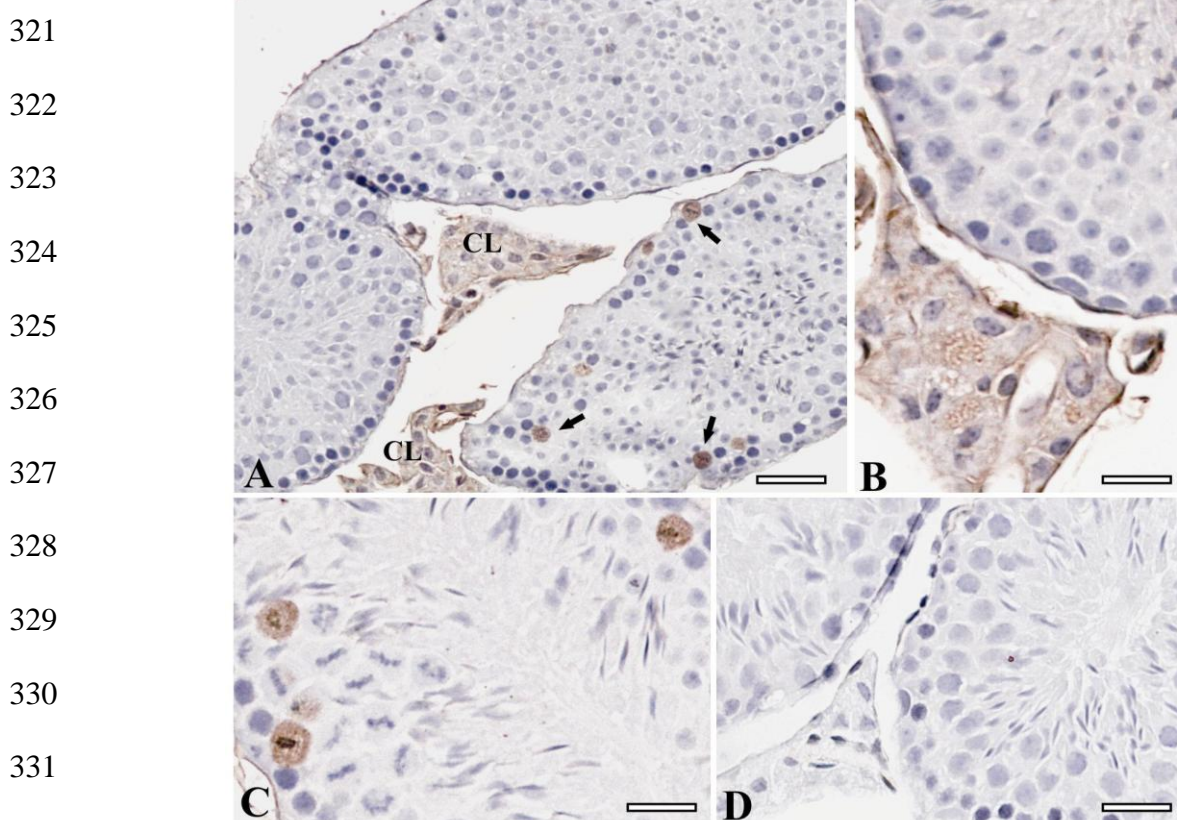
312

313

314

### 315 5.3 Imunohistoquímica

316 Através da imunohistoquímica, foi possível caracterizar a presença da Ang-(1-7) em  
317 testículos de camundongos adultos (Fig. 5). A marcação positiva para Ang-(1-7) pode ser  
318 visualizada nas células de Leydig e pontualmente em algumas células germinativas. Não foi  
319 visualizada marcação em células Sertoli, bem como em outras regiões do testículo. O controle  
320 negativo apresenta ausência de marcação.



321  
322  
323  
324  
325  
326  
327  
328  
329  
330  
331  
332 **Figura 5:** Imunolocalização de Angiotensina 1-7 em testículos de camundongos C57  
333 com 3 meses de idade. A) Marcação positiva (marrom) para células de Leydig e  
334 pontualmente para algumas células da linhagem espermatogênica (setas); B) Conjunto  
de células de Leydig com marcação positiva; C) Células espermatogênicas com  
marcação positiva; D) Controle negativo (Barras A = 60µm; B, C e D = 30µm).

335

336 Estudos anteriores mostraram a presença de do receptor MAS nas células de Leydig e  
337 Sertoli de camundongo (ALENINA et al, 2002; PINHEIRO, 2004), corroborando com os dados

338 obtidos no presente estudo. A Ang-(1-7) é possivelmente sintetizada pelo próprio testículo, já que  
339 o mesmo expressa mRNA para angiotensinogênio (DZAU et al, 1987)

340 É importante ressaltar que foi observada imunolocalização para ang-(1-7) em algumas  
341 células em túbulos seminíferos, sugerindo a participação desse peptídeo na espermatogênese. O  
342 receptor MAS também foi identificado por imunohistoquímica fluorescente em células dos  
343 túbulos seminíferos de camundongo (PINHEIRO, 2004) e em todas as células da linhagem  
344 germinativa de testículos humanos, incluindo espermatozóides (REIS, 2006).

345 Em síntese, as dosagens de testosterona no plasma e meio de incubação apresentaram uma  
346 grande variabilidade, não permitindo concluir sobre o efeito do tratamento oral da Ang-(1-7) na  
347 síntese desse hormônio esteróide. Os pesos dos testículos, vesículas seminais e próstata não  
348 apresentaram diferença entre os diferentes tratamentos. Porém, o tecido adiposo epididimal do  
349 grupo tratado com Ang-(1-7) foi significativamente superior ao do grupo que recebeu o  
350 antagonista isoladamente ou Ang-(1-7) associada ao antagonista. Foi observado  
351 imunorreatividade para Ang-(1-7) nas células de Leydig e marcação em algumas células  
352 germinativas. Por se tratar de tratar de órgão perfundido até o clareamento, é provável o peptídeo  
353 tenha sido produzido localmente.

354 Com isso, o presente estudo permite chegar as seguintes conclusões: 1) os modelos de  
355 dosagem no plasma e incubação *in vitro* não foram adequados para o estudo do efeito da Ang-(1-  
356 7), aplicada via oral, sobre a esteroidogênese testicular; 2) O resultado do tratamento oral com  
357 Ang-(1-7) e A779 indica influência desse peptídeo sobre o peso do tecido adiposo, o que sugere  
358 sua participação na fisiologia desse tecido e abre a possibilidade de mais estudos para elucidar  
359 seus mecanismos de ação; 3) A localização da Ang-(1-7) nas células de Leydig, sugere sua  
360 participação na fisiologia testicular.

361 **6. Referências Bibliográficas**

362

363 ALENINA N.; BARANOVA, T.; SMIRNOW, E.; BADER, M.; LIPPOLDT, A.; PATKIN, E.;  
364 WALTHER, T. Cell type-specific expression of the Mas proto-oncogene in testis. *J Histochem*  
365 *Cytochem*, v. 50, n. 5, p. 691-6. 2002.

366

367 ARDAILLOU, R. Angiotensin II receptors. *J Am. Soc. Nephrol.*, v. 10, p. S30-S39, 1999.

368

369 BAKER, P. J.; SHA, J. A.; MCBRIDE, M. W.; PENG, L.; PAYNE, A. H.; O'SHAUGHNESSY,  
370 P. J. Expression of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type I and type VI isoforms in the mouse  
371 testis during development. *Eur J Biochem*, v. 260, p. 911-7, 1999.

372

373 BLOCK, C.H.; SANTOS, R. A.; BROSNIHAN, K. B.; FERRARIO, C. M. Immunocytochemical  
374 localization of angiotensin-(1-7) in the rat forebrain. *Peptides*, v. 9, n. 6, p. 1395-401, 1988.

375

376 BURRELL, L. M.; JOUNHSTON, C. I.; TIKELLIS, C.; COOPER, M. E. ACE2, a new regulator  
377 of the renin-angiotensin system. *Trends Endocrinol Metab*, v. 15, n.4, p. 166-169, 2004.

378

379 CASTRO, C. H.; SANTOS, R. S.; FERREIRA, A. J.; BADER, M.; ALENINA, N.; ALMEIDA,  
380 A. P. Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor MAS with AT1 And  
381 AT2 receptors in the mouse heart. *Hypertension*, v. 46, n.4, p. 937-42. 2005.

382

383 COSTA, A. P. R.; FAGUNDES-MOURA, C. R.; PEREIRA, V. M.; SILVA, L. F.; VIEIRA, M.  
384 A. R.; SANTOS, R. A. S.; DOS REIS, A. M. Angiotensin-(1-7): A novel peptide in the ovary.  
385 *Endocrinology*, v.144, n.5, p.1942-1948, 2003.

386

387 DARIMONT C, VASSAUX G, AILHAUD G, NEGREL R. Differentiation of preadipose cells:  
388 paracrine role of prostacyclin upon stimulation of adipose cells by angiotensin-II. *Endocrinology*,  
389 v.135, p.2030–2036, 1994a.

390

391 DARIMONT, C.; VASSAUX, G.; GAILLARD, D.; AILHAUD, G.; NÉGREL, R. *In situ*  
392 microdialysis of prostaglandins in adipose tissue: stimulation of prostacyclin release by  
393 angiotensin II. *Int J Obes Relat Metab Disord*, v. 18, p. 783–788, 1994b.

394

395 DONOGHUE, M.; HSIEH, F.; BARONAS, E.; GODBOUT, K.; GOSELIN, M.; STAGLIANO,  
396 N.; DONOVAN, M.; WOOLF, V.; ROBISON, K.; JEYASEELAN, R.; BREITBART, R. E.;  
397 ACTON, S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase ( ACE2)  
398 angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*, v. 87, n. 5, p. E 1-9. 2000.

399

400 DUSSERE, E.; MOULIN, P.; VIDAL, H. Differences in mRNA expression of the proteins  
401 secreted by the adipocytes in human subcutaneous and visceral adipose tissues. *Biochim Biophys*  
402 *Acta*; v. 1500, p. 88–96, 2000.

403

404 DZAU, V. J.; ELLISON, K. E.; BRODY, T.; INGELFINGER, J.; PRATT, R. E. A comparative  
405 study of the distributions of renin and angiotensinogen messenger ribonucleic acids in rat and  
406 mouse tissues. *Endocrinology*, 120: 2334–2338, 1987.

407

408 ENGELI, S.; SCHLING, P.; GORZELNIAK, K.; BOSCHMANN, M.; JANKE, J.; AILHAUD,  
409 G.; TEBOUL, M.; MASSIÉRA, F.; SHARMA, A. M. The adipose-tissue renin–angiotensin–  
410 aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *The International Journal of Biochemistry*  
411 *& Cell Biology*, v. 35, p. 807–825, 2003.

412

413 FALOIA, E.; GATTI, C.; CAMILLONI, M. A.; MARINIELLO, B.; SARDU, C.; GARRAPA,  
414 G. G.; MANTERO, F.; GIACCHETTI, G. Comparison of circulating and local adipose-tissue  
415 renin–angiotensin system in normotensive and hypertensive obese subjects. *J Endocrinol Invest*;  
416 v. 25, p. 309–314, 2002.

417

418 GIACCHETTI, G.; FALOIA, E.; MARINIELLO, B.; SARDU, C.; GATTI, C.; CAMILLONI,  
419 M. A.; GUERRIERI, M.; MANTERO, F. Overexpression of the renin– angiotensin system in  
420 human visceral adipose tissue in normal and overweight subjects. *Am J Hypertens*; v. 15, p.381–  
421 388. 2002.

422

423 HARDY, M. P.; SOTTAS, C. M.; GE, R.; MCKITTRICK, C. R.; TAMASHIRO, K. L.  
424 MCEWEN, B. S.; HAIDER, S. G.; MARKHAM, C. M.; BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD,  
425 D. C.; SAKAI, R. R.. Trends of Reproductive Hormones in Male Rats During Psychosocial

426 Stress: Role of Glucocorticoid Metabolism in Behavioral Dominance. *Biology of Reproduction*,  
427 v. 67, p. 1750–1755, 2002.

428

429 JONES, B. H.; STANDRIDGE, M. K.; MOUSIAID, N. Angiotensin II increases lipogenesis in  
430 3T3-L1 and human adipose cells. *Endocrinology* v. 138, p. 1512–1519, 1997.

431

432 KHANUM, A.; DUFAU, M. L. Angiotensin II receptors and inhibitory actions in Leydig cells. *J*  
433 *Biol Chem, Baltimore*, v.263, p. 5070-5074, 1988.

434

435 KIM, S.; IWAO, H. Molecular and cellular and cellular mechanisms of Angiotensin II- mediated  
436 cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev*, v. 52, p. 11-34, 2001.

437

438 LAVOIE, J. L.; SIGMUND, C. D. Minireview: overview of the renin-angiotensin system – an  
439 endocrine and paracrine system. *Endocrinology*, v. 144, n. 6, p. 2179-83, 2003.

440

441 LULA, I.; DENADAI, A. L.; RESENDE, J. M.; SOUSA, F. B.; LIMA, G. F.; PILO-VELOSO,  
442 D.; HEINE, T.; DUARTE, H.; SANTOS, R. A. S.; SINISTERRA, R. D. Study of angiotensin-(1–  
443 7) vasoactive peptide and its b-cyclodextrin inclusion complexes: Complete sequence-specific  
444 NMR assignments and structural studies. *Peptides*, v. 28, p. 2199–2210, 2007.

445 METZGER, R.; BADER, M.; LUDWIG, T.; BERBERICH, C.; BUNNEMANN, B.; GANTEN,  
446 D. Expression of the mouse and rat MAS proto-oncogene in the brain and peripheral tissues.  
447 *FEBS Lett*, v.357, p27-32, 1995.

448 NEGREL R. Prostacyclin as a critical prostanoïd in adipogenesis. *Prostaglandins Leukot Essent*  
449 *Fatty Acids*, v. 60, p. 383–386, 1999.

450

451 PAUL, M.; POYAN MEHR, A.; KREUTZ, R. Physiology of local renin-angiotensin systems.  
452 *Physiol Rev*, v. 86, n. 3, p. 747-803, 2006.

453

454 PEREIRA, V. M. *Angiotensina-(1-7) e Receptor Mas e alterações morfofuncionais no ovário da*  
455 *rata*. 2004. 123 f. Tese (Doutorado em Fisiologia) - Instituto de Ciências Biológicas,  
456 Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2004.

457

458 PINHEIRO, S. V. B. *Aspectos Morfológicos e Funcionais da Interação Angiotensina-(1-7)-*  
459 *Receptor MAS*. 105 p. Tese (Doutorado em Fisiologia) - Instituto de Ciências Biológicas,  
460 Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2004.

461

462 RANKINEN, T.; GAGNON, J.; PÉRUSSE, L.; RICE, T.; LEON, A. S.; SKINNER, J. S.;  
463 WILMORE, J. H.; RAO, D. C.; BOUCHARD, C. Body fat, resting and exercise blood pressure  
464 and the angiotensinogen M235T polymorphism: the heritage family study. *Obes Res*, v. 7, p.  
465 423–430. 1999.

466

467 REIS, A. B. *Expressão da angiotensina 1-7 no testículo humano*. Dissertação (Mestrado em  
468 Fisiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo  
469 Horizonte, 2006.

470



471 ROKS, A. J. M.; VAN GEEL, P. P.; PINTO, Y. M.; BUIKEMA, H.; HENNING, R. H.;  
472 ZEEUW, D.; VAN GILST, W. H. Angiotensin-(1-7) is a modulator of the human renin-  
473 angiotensin system. *Hypertension*, v. 34, p. 296-301,1999.

474

475 RUIZ-DE-LA-TORRE, J. L.; MANTECA, X. Effects of testosterone on aggressive behaviour  
476 after social mixing in male lambs. *Physiol. Behav.*,v. 68, p. 109–113, 1999.

477

478 SANTOS, R. A. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; ANDRADE, S. P. Angiotensin- (1-7): an  
479 update. *Regul Pept.*, v. 91, p. 45-62, 2000a.

480

481 SANTOS, R. A. S.; FAGUNDES-MOURA, C. R.; SIMÕES E SILVA, A. C. Efeitos  
482 Cardiovasculares e renais do sistema renina-angiotensina. *Rev Bras Hipertens*, v. 3, p. 227- 236,  
483 2000b.

484

485 SANTOS, R. A.; BROSNIHAN, K. B.; CHAPPELL, M. C.; PESQUERO, J.; CHERNICKY, C.  
486 L.; GREENE, L. J.; FERRARIO, C. M. Converting enzyme activity and angiotensin metabolim  
487 in the dog brainstem. *Hypertension* , v. 11, p. 153-7, 1988.

488

489 SANTOS, R. A.; SIMOES, A. C.; MARIC, C.; SILVA, D. M.; MACHADO, R. P.; DE BUHR,  
490 I.; HERINGER-WALTHER, S. V.; LOPES, M. T.; BADER, M.; MENDES; E. P.; LEMOS, V.  
491 S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SCHULTHEISS, H. P.; SPETH, R.; WALTHER, T.  
492 Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled reprot Mas. *Proc Natl acad*  
493 *Sci U S A*, v. 100, n. 14, p. 8258-63, 2003.

494 SCHLING, P.; MALLOW, H.; TRINDL, A.; LOFFLER, G. Evidence for a local renin-  
495 angiotensin system in primary cultured human preadipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord*, v.  
496 23, p. 336–341, 1999.

497

498 SPETH, R. C.; DAUBERT, D. L.; GROVE, K. L. Angiotensin II: a reproductive hormone too?  
499 *Regulatory Peptides*, v. 79, p. 25–40, 1999.

500

501 STRAZZULLO, P.; GALLETTI, F. Impact of the renin-angiotensin system on lipid and  
502 carbohydrate metabolism. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. v. 13, n. 3, p. 325-32, 2004.

503

504 TRACHTE, G. J.; MEIXNER, K.; FERRARIO, C. M.; KHOSLA, M. C. Prostaglandin  
505 production in response to angiotensin-(1-7) in rabbit isolated vasa deferentia. *Prostaglandins*, v.  
506 39, n. 4, p.385-94, 1999.

507

508 VIANA, G. E. N. *Angiotensina-(1-7) em ovários de coelha: efeitos sobre a esteroidogênese e*  
509 *ovulação*. 2005. Tese (Doutorado em Fisiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade  
510 Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

511

512 VIANA, G. E. N.; PEREIRA, V. M.; SANTOS, R. A. S.; MOURA, C. F.; REIS, A. M.  
513 *Angiotensina-(1-7) um novo modulador endógeno da produção de progesterona*. In: XXXVIII  
514 Congresso da Sociedade Brasileira de Fisiologia – SBFis, XXI Congresso da Associação  
515 Latinoamericana de Ciências Fisiológicas - ALACAF, 2003, Ribeirão Preto - SP - Brasil.

516

517 WALTHER, T.; BALSCHUN, D.; VOIGT, J. P.; FINK, H.; ZUSCHRATTER, W.;  
518 BIRCHMEIER, C.; GANTEN, D.; BADER, M.; Sustained Long-term potentiation and anxiety in  
519 mice lacking the Mas protooncogene, *J Biol Chem*, v. 273, p. 11867-73, 1998.  
520  
521 XU, P.; SANTOS, R. A. S.; BADER, M.; ALENINA, N. Alterations in gene expression in the  
522 testis of angiotensin-(1-7)-receptor Mas-deficient mice. *Regulatory Peptides*, v. 138, p. 51-55,  
523 2007.  
524  
525 YOSHIMURA, Y. The ovarian rennin-angiotensin system in reproductive physiology. *Front*  
526 *Neuroendocrinol*, v. 18, n. 3, p. 247-291, 1997.

## 7. Referencias Bibliograficas da introdução

AGUILERA, G.; MILLAN, M. A.; HARWOOD, J. P. Angiotensin II receptors in the gonads. *Am J Hypertens*, v.2, n.5 Pt 1, p.395-402. 1989.

ALENINA, N.; BADER, M.; WALTHER, T. Imprinting of the murine MAS protooncogene is restricted to its antisense RNA. *Biochem Biophys Res Commun*, v.290, n.3, p.1072-8. 2002b.

ALENINA, N.; BARANOVA, T.; SMIRNOW, E.; BADER, M.; LIPPOLDT, A.; PATKIN, E.; WALTHER, T. Cell type-specific expression of the Mas proto-oncogene in testis. *J Histochem Cytochem*, v.50, n.5, p.691-6. 2002.

ARDAILLOU, R. Angiotensin II receptors. *J Am. Soc. Nephrol.* 10:S30-S39.1999.

RAUN-MENENDEZ, E.; PAGE, I. H. Suggested Revision of Nomenclature--Angiotensin. *Science*, v.127, n.3292, p.242. 1958.

BRAUNSTEIN GD. Testes. In: *Basic & Clinical Endocrinology*. Greenspan FS & Strewler GJ. 5ed. Cap. 12, p. 403-433. 1993.

BUNNEMANN, B.; FUXE, K.; METZGER, R.; MULLINS, J.; JACKSON, T. R.; HANLEY, M. R.; GANTEN, D. Autoradiographic localization of mas proto-oncogene mRNA in adult rat brain using in situ hybridization. *Neurosci Lett*, v.114, n.2, p.147-53. 1990.

BURREL, I. M. JOHNSTON et al. ACE2, a new regulator of the renin-angiotensin system. *Trends Endocrinol Metab*; 15(4): 166-9. 2004.

BLOCK, C.H., SANTOS, R.A., BROSNIHAN, K.B.; FERRARIO, C.M. Immunocytochemical localization of angiotensin-(1-7) in the rat forebrain. *Peptides*, v. 9, n. 6, p. 1395-401, 1988.

CHAPPELL, M. C.; ALLRED, A. J.; FERRARIO, C. M. Pathways of angiotensin-(1-7) metabolism in the kidney. *Nephrol Dial Transplant*, v.16 Suppl 1, p.22-6. 2001.

CHEN, Y. D.; KRAEMER, F. B.; REAVEN, G. M. Identification of specific high density lipoprotein-binding sites in rat testis and regulation of binding by human chorionic gonadotropin. *J Biol Chem*, v.255, n.19, p.9162-7. 1980.

CLARK, B. J.; WELLS, J.; KING, S. R.; STOCCO, D. M. The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Biol Chem*, v.269, n.45, p.28314-22. 1994.

COSTA, A. P.; FAGUNDES-MOURA, C. R.; PEREIRA, V. M.; SILVA, L. F.; VIEIRA, M. A.; SANTOS, R. A.; DOS REIS, A. M. Angiotensin-(1-7): a novel peptide in the ovary. *Endocrinology*, v.144, n.5, p.1942-8. 2003.

CULLER, M. D.; TARLATZIS, B. C.; LIGHTMAN, A.; FERNANDEZ, L. A.; DECHERNEY, A. H.; NEGRO-VILAR, A.; NAFTOLIN, F. Angiotensin II-like immunoreactivity in human ovarian follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab*, v.62, n.3, p.613-5. 1986.

CUSHMAN, D. W.; CHEUNG, H. S. Concentrations of angiotensin-converting enzyme in tissues of the rat. *Biochim Biophys Acta*, v.250, n.1, p.261-5. 1971.

DEKRETSER DM AND KERR JB. The cytology of the testis. In: *The Physiology of Reproduction*. Knobil & Neil. Raven Press Ltd, New York, p.837-932, 1988.

DESCHEPPER, C. F.; MELLON, S. H.; CUMIN, F.; BAXTER, J. D.; GANONG, W. F. Analysis by immunocytochemistry and in situ hybridization of renin and its mRNA in kidney, testis, adrenal, and pituitary of the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.83, n.19, p.7552-6. 1986.

DONOGHUE, M. et al. A novel angiotensin converting enzyme related carboxy peptidase (ACE 2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Cir Res*, Baltimore, v. 87, p E1-E2, 2000.

FERNANDEZ, L. A.; TARLATZIS, B. C.; RZASA, P. J.; CARIDE, V. J.; LAUFER, N.; NEGRO-VILAR, A. F.; DECHERNEY, A. H.; NAFTOLIN, F. Renin-like activity in ovarian follicular fluid. *Fertil Steril*, v.44, n.2, p.219-23. 1985.

FREEMAN, D. A. Regulation of the cholesterol ester cycle of cultured Leydig tumor cells. *Eur J Biochem*, v.164, n.2, p.351-6. 1987.

GOLDBLATT H, LYNCH J, HANZAL RF, SUMMERVILLE WW. Studies on experimental hypertension. I. Production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of reanl ischemia. *Journal of Experimental Medicine*, 59: 347-349, 1934.

GONZÁLES, E.H.D. Introdução a Endocrinologia Reprodutiva Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

HALL PF. Testicular steroid synthesis: organization and regulation. In: *The Physiology of Reproduction (2nd edition)* edited by Knobil E and Neill JD. New York:Raven Press, 1994, p975-998.

HALL PF. The effect of interstitial cell-stimulating hormone on the biosynthesis of testicular cholesterol from acetate-1-C14. *Biochemistry*, v.2, p.1232-1236, 1963.

HOHLBREGGER, G.; SCHWEISFURTH, H.; DAHLHEIM, H. Angiotensin Iconverting enzyme in rat testis epididymis and vas deferens under differentconditions. *J Reprod Fertil*, Galveston, v. 65 p 97-103, 1982.

HUSAIN, A.; BUMPUS, F. M.; DE SILVA, P.; SPETH, R. C. Localization of angiotensin II receptors in ovarian follicles and the identification of angiotensin II in rat ovaries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.84, n.8, p.2489-93. 1987.

ITSKOVITZ, J.; BRUNEVAL, P.; SOUBRIER, F.; THALER, I.; CORVOL, P.; SEALEY, J. E. Localization of renin gene expression to monkey ovarian theca cells by in situ hybridization. *J Clin Endocrinol Metab*, v.75, n.5, p.1374-80. 1992.

KHANUM, A.; DUFAU, M. L. Angiotensin II receptors and inhibitory actions in Leydig cells. *J Biol Chem*, v.263, n.11, p.5070-4. 1988.

KIM, S.; IWAO, H. Molecular and cellular and cellular mechanisms of Angiotensin II- mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev*; 52: 11-34.2001.

KITAMI, Y.; OKURA, T.; MARUMOTO, K.; WAKAMIYA, R.; HIWADA, K. Differential gene expression and regulation of type-1 angiotensin II receptor subtypes in the rat. *Biochem Biophys Res Commun*, v.188, n.1, p.446-52. 1992.

LEUNG, P. S.; CHAN, H. C.; FU, L. X.; LEUNG, P. Y.; CHEW, S. B.; WONG, P. Y. Angiotensin II receptors: localization of type I and type II in rat epididymides of different developmental stages. *J Membr Biol*, v.157, n.1, p.97-103. 1997.

LIGHTMAN, A.; TARLATZIS, B. C.; RZASA, P. J.; CULLER, M. D.; CARIDE, V. J.; NEGRO-VILAR, A. F.; LENNARD, D.; DECHERNEY, A. H.;NAFTOLIN, F. The ovarian renin-angiotensin system: renin-like activity and angiotensin II/III immunoreactivity in gonadotropin-stimulated and unstimulated human follicular fluid. *Am J Obstet Gynecol*, v.156, n.4, p.808-16. 1987.

MARSH, J. M. The role of cyclic AMP in gonadal steroidogenesis. *Biol Reprod*, v.14, n.1, p.30-53. 1976.

METZGER, R. et al. Expression of the mouse and rat MAS proto-oncogene in the brain and peripheral tissues. *FEBS Lett*, Amsterdam, v.357, p27-32, 1995.

MILLAN, M. A.; AGUILERA, G. Angiotensin II receptors in testes. *Endocrinology*, v.122, n.5, p.1984-90. 1988.

MILLER, W. L.; STRAUSS, J. F., 3RD. Molecular pathology and mechanism of action of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR. *J Steroid Biochem Mol Biol*, v.69, n.1-6, p.131-41. 1999.

MORRIS, M. D.; CHAIKOFF, I. L. The origin of cholesterol in liver, small intestine, adrenal gland, and testis of the rat: dietary versus endogenous contributions. *J Biol Chem*, v.234, n.5, p.1095-7. 1959.

OHKUBO, H.; NAKAYAMA, K.; TANAKA, T.; NAKANISHI, S. Tissue distribution of rat angiotensinogen mRNA and structural analysis of its heterogeneity. *J Biol Chem*, v.261, n.1, p.319-23. 1986.

PAGE, I.; HELMER, OM. A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin activator. *Journal of Experimental Medicine*, 71:29, 1940.

PANDEY, K. N.; MISONO, K. S.; INAGAMI, T. Evidence for intracellular formation of angiotensins: coexistence of renin and angiotensin-converting enzyme in Leydig cells of rat testis. *Biochem Biophys Res Commun*, v.122, n.3, p.1337-43. 1984.

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

PAULSON, R. J.; DO, Y. S.; HSUEH, W. A.; EGGENA, P.; LOBO, R. A. Ovarian renin production in vitro and in vivo: characterization and clinical correlation. *Fertil Steril*, v.51, n.4, p.634-8. 1989.

PARKER, K.L.; SCHIMMER, B.P. Steroidogenic Factor 1: A Key Determinant of Endocrine Development and Function. *Endocrine Reviews*, v.18, n.3, p. 361-7.1997.

PAYNE, AH.; AND O'SHAUGHNESSY, PJ. Structure, Function and Regulation of Steroidogenic Enzymes in the Leydig Cell. In: *The Leydig Cell*, Cap 1, p.259-285, 1996.

PEREIRA, V. M. **Angiotensina-(1-7) e Receptor Mas e alterações morfofuncionais no ovário da rata**. 2004. 123 f. Tese (Doutorado em Fisiologia) -Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.



ROKS, A. J.; VAN GEEL, P. P.; PINTO, Y. M.; BUIKEMA, H.; HENNING, R. H.; DE ZEEUW, D.; VAN GILST, W. H. Angiotensin-(1-7) is a modulator of the human renin-angiotensin system. *Hypertension*, v.34, n.2, p.296-301. 1999.

REIS, A. B. *Expressão da angiotensina 1-7 no testículo humano*. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

SANTOS, R. A.; SIMOES E SILVA, A. C.; MARIC, C.; SILVA, D. M.; MACHADO, R. P.; DE BUHR, I.; HERINGER-WALTHER, S.; PINHEIRO, S. V.; LOPES, M. T.; BADER, M.; MENDES, E. P.; LEMOS, V. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SCHULTHEISS, H. P.; SPETH, R.; WALTHER, T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.100, n.14, p.8258-63. 2003.

SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; ANDRADE, S. P. Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept*, v.91, n.1-3, p.45-62. 2000.

SANTOS, RAS.; FAGUNDES- MOURA, CR AND SIMÕES E SILVA, AC. Efeitos Cardiovasculares e renais do sistema renina-angiotensina. *Rev Bras Hipertens*; 3: 227- 236. 2000b

SANTOS, R. A.; BROSNIHAN, K. B.; CHAPPELL, M. C.; PESQUERO, J.; CHERNICKY, C. L.; GREENE, L. J.; FERRARIO, C. M. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension*, v.11, n.2 Pt 2, p.1153-7. 1988.

SETCHELL, BP. Male reproductive organs and semen. In: *Reproduction in domestic animals. Cupps PT, Acad Press, New York*, p.221-249, 1991.

SHARPE R.M.: Intratesticular factors controlling testicular function. *Biol Reprod*, v.30, p.29-49, 1984.

SKEGGS LT, KAHN JR, SHUMWAY NP. Preparation and function of the hypertension-converting enzyme. *J Exp Med* 1956; 103: 295–299.

SPETH, R. C.; HUSAIN, A. Distribution of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II-receptor binding sites in the rat ovary. *Biol Reprod*, v.38, n.3, p.695-702. 1988.

SPETH, R. C.; DAUBERT, D. L.; GROVE, K. L. Angiotensin II: a reproductive hormone too? *Regul Pept*, v.79, n.1, p.25-40. 1999.

STOCCO, DM. Acute Regulation of Leydig Cell Steroidogenesis. *The Leydig Cell*, Cap 11, 1996.

TEERDS, KJ. Aspects of Leydig cell development in the rat testis. Cap.:1, p.7-21, 1998.

TIEGERSTEDT, R.; BERGAMAN PG. Niere um Kreislauf. *Skandinavisches Archiv fur Physiologie*, 8: 223-271, 1889.

VERHOEVEN, G.; CAILLEAU, J. Influence of coculture with Sertoli cells on steroidogenesis in immature rat Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol*, v.71, n.3, p.239-51. 1990.

VIANA, G. E. N. **Angiotensina-(1-7) em ovários de coelha: efeitos sobre a esteroidogênese e ovulação.** 2005. Tese (Doutorado em Fisiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

VIANA, G. E. N.; PEREIRA, V. M.; SANTOS, R. A. S.; MOURA, C. F.; REIS, A. M. *Angiotensina-(1-7) um novo modulador endógeno da produção de progesterona.* In: XXXVIII

Congresso da Sociedade Brasileira de Fisiologia – SBFis, XXI Congresso da Associação Latinoamericana de Ciências Fisiológicas - ALACAF, 2003, Ribeirão Preto - SP - Brasil.

UCHENDU, C.N. Renin-like activity in the rat epididymis 1995. *Indian J Physiol Pharmacol*, Nova Delhi, v.39, p.204-209, 1995.

WALTHER, T.; BALSCHUN, D.; VOIGT, J. P.; FINK, H.; ZUSCHRATTER, W.; BIRCHMEIER, C.; GANTEN, D.; BADER, M. Sustained long term potentiation and anxiety in mice lacking the Mas protooncogene. *J Biol Chem*, v.273, n.19, p.11867-73. 1998.

WONG, P.Y. et al. Effect of angiotensins on electrogenic anion transport in monolayer cultures of the rat epididymis. *J Endocrinol*, Baltimore, v25, p.449-456, 1990.

ZISMAN, L. S.; KELLER, R. S.; WEAVER, B.; LIN, Q.; SPETH, R.; BRISTOW, M. R.; CANVER, C. C. Increased angiotensin-(1-7)-forming activity in failing human heart ventricles: evidence for upregulation of the angiotensin-converting enzyme Homologue ACE2. *Circulation*, v.108, n.14, p.1707-12. 2003.