

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - CAMPUS DE  
CASCAVEL

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM BIOCÊNCIAS E  
SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

**CRISTIANE GISSELD A GOBO**

**EFEITO DO TRATAMENTO COM LOSARTAN SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO FOLICULAR DE RATAS WISTAR  
ADULTAS COM OBESIDADE INDUZIDA PELA DIETA DE  
CAFETERIA**

CASCAVEL-PR

(Julho/2014)

**CRISTIANE GISSELDA GOBO**

**EFEITO DO TRATAMENTO COM LOSARTAN SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO FOLICULAR DE RATAS WISTAR  
ADULTAS, COM OBESIDADE INDUZIDA PELA DIETA  
DE CAFETERIA**

Dissertação apresentada ao Programa De Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biociências e Saúde – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

ORIENTADORA: Prof. Dra. Sandra  
Lucinei Balbo

CO-ORIENTADORA: Prof. Dra. Sara  
Cristina Sagae

CASCADEL-PR

(julho/2014)

FOLHA DE APROVAÇÃO

CRISTIANE GISSELDA GOBO

**EFEITO DO TRATAMENTO COM LOSARTAN SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO FOLICULAR DE RATAS WISTAR  
ADULTAS, COM OBESIDADE INDUZIDA PELA DIETA  
DE CAFETERIA**

**Esta dissertação foi julgada adequada  
para a obtenção do título de Mestre em  
Biociências e Saúde e aprovada em  
sua forma final pela Orientadora e pela  
Banca Examinadora.**

Orientadora: Prof. Dra Sandra Lucinei Balbo

UNIOESTE

Co-orientadora: Prof. Dra. Sara Cristina Sagae

UNIOESTE

Prof. Dr. Márcio Vinicius Fagundes Donadio

PUC – RS

Prof. Dra. Maria Lucia Bonfleur

UNIOESTE

CASCADEL-PR

(Julho/2014)

À todos que estão em busca de conhecimento.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pela minha vida.

Aos meus pais, Lenir e Gisselda, pelo exemplo de nunca desistir, de persistir, de sempre buscar.

Ao meu esposo, Fernando, pelo incentivo, companheirismo, compreensão.

Aos meus filhos, Eduardo e Guilherme, motivo da minha força de lutar sempre.

À UNIOESTE , como Instituição, por ter me proporcionado desenvolver este estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, a todos os Professores e Funcionários, por contribuir em aumentar meu conhecimento, não só científico, mas também, cultural, político e social.

Às minhas queridas, orientadora e co-orientadora, Sandra L. Balbo e Sara C. Sagae, sempre com um sorriso, sempre com uma palavra positiva, foram muito além do conhecimento e me mostraram um lado mais que humano.

À todos os colegas do Laboratório de Fisiologia, especialmente Edson Duarte, Camila Lubaczeuski e Mariana, que muito me ajudaram, me transmitiram seus conhecimentos com muita transparência, com muito desprendimento.

À Merck, na pessoa do Representante Alexandre, que me forneceu algumas caixas do medicamento losartan, com o único intuito de incentivar a pesquisa.

## RESUMO GERAL

A prevalência da obesidade aumentou nas últimas décadas em vários países, tendo efeitos prejudiciais ao organismo que podem iniciar na infância e persistir até a vida adulta. A obesidade está associada a distúrbios da função reprodutiva, em mulheres e em fêmeas de roedores, como início precoce da puberdade, alteração do ciclo menstrual/estral e infertilidade, com alterações da ovulação (disovulias) ou anovulação (ausência da ovulação). A Angiotensina II (Ang II) parece exercer efeitos sobre a reprodução e a obesidade, contribuindo para o desenvolvimento dos efeitos deletérios da obesidade e afetando o pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH), progesterona e estradiol, reduzindo, conseqüentemente, a ovulação em ratas adultas. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do losartan, um antagonista do receptor AT1 da Ang II, sobre o desenvolvimento folicular de ratas *Wistar* adultas, com obesidade induzida pela dieta de cafeteria. Após o desmame, aos 21 dias de vida, ratas *Wistar* foram separadas em 02 grupos: controle (CTL) que recebeu ração padrão e Cafeteria (CAF) que recebeu a dieta de cafeteria. A partir dos 70 dias de vida iniciou-se a administração de losartan por gavagem. O grupo CTL recebeu água na gavagem (CTL) e o grupo CAF foi separado em 02 grupos, CAF (que recebeu água na gavagem) e CAF+LOS (que recebeu losartan na gavagem), totalizando 03 grupos. Foram utilizados 05 animais por grupo. A eutanásia foi realizada no primeiro proestro após 30 dias da administração de losartan ou de água. As gorduras retroperitoneal, perigonadal e subcutânea foram retiradas e pesadas. Foi realizada a análise morfológica dos ovários, procedendo-se a contagem do número dos folículos primários, secundários, antrais e maduros por ovário. Também foi coletado o sangue total para dosagens de FSH, LH, Prolactina e Progesterona. O peso corporal, bem como, o peso das 03 gorduras foram avaliados, e, o número de folículos antrais foi estatisticamente maior no grupo CAF em relação ao CTL ( $p < 0,001$ ). Todavia, as concentrações de FSH e LH foram menores nos animais CAF em relação ao CTL ( $p < 0,001$ ). A administração do losartan normalizou o peso corporal e o acúmulo das gorduras retroperitoneal e subcutânea, bem como, o número de folículos antrais. Dessa forma, sugerimos que o uso do antagonista do receptor AT1 da Ang II, o losartan, na vida adulta, possa contribuir para melhorar o desenvolvimento folicular em fêmeas com obesidade induzida pela dieta de cafeteria e, futuramente, ser uma droga coadjuvante no tratamento da infertilidade associada à obesidade.

**Palavras-Chave:** Obesidade, Infertilidade, Angiotensina II, Losartan, Desenvolvimento Folicular.

## GENERAL ABSTRACT

The prevalence of obesity has increased in recent decades in many countries, and harmful effects to the body can begin in childhood and persist into adulthood. Obesity is associated with disturbances of reproductive function in women and in female rodents, such as early onset of puberty, change in menstrual / estrous cycle and infertility, with impaired ovulation or anovulation (lack of ovulation). Angiotensin II (Ang II) appears to exert effects on reproduction and obesity, contributing to the development of the deleterious effects of obesity and affecting pre-ovulatory surge of luteinizing hormone (LH), estradiol and progesterone, thus reducing ovulation in adult rats. The objective of this study was to evaluate losartan effect, an antagonist of Ang II AT1 receptor, administered in adulthood, in follicular development of adult *Wistar* rats with obesity induced by cafeteria diet. After weaning at 21 days of life, female *Wistar* rats were divided into 02 groups: control (CTL) that received standard chow diet; Cafeteria (CAF) received the cafeteria diet. From 70 days of life began losartan administration by gavage. The CTL group received water in gavage (CTL) and CAF group was separated into 02 groups, CAF (which received water in gavage) and CAF + LOS (who received losartan in gavage), in total 03 groups were performed. 05 animals were used per group. Euthanasia was performed on the first proestrous after 30 days of administration of losartan or water. The retroperitoneal, perigonadal and subcutaneous fat were removed and weighed. Morphological analysis of ovaries was performed, proceeding to count the number of primary follicles, secondary, antral and mature follicles per ovary. Was also collected blood sample for determination of FSH, LH, prolactin and progesterone. Body weight and the weight of the 03 fats were measured, and the number of antral follicles were higher in group CAF in relation to the group CTL ( $p < 0.001$ ). However, FSH and LH levels were lower in the CAF animals compared to the animals of the group CTL ( $p < 0.001$ ). The administration of losartan normalized the body weight and accumulation of retroperitoneal and subcutaneous fat as well as the number of antral follicles. Thus, we suggest that the use of the antagonist of Ang II AT1 receptor, losartan, in adulthood, can improve follicular development in females with cafeteria diet-induced obesity and, can be, in the future, an adjuvant drug in the treatment of infertility associated to obesity.

**Keywords:** Obesity, Infertility, Angiotensin II, Losartan, Follicle development

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>5</b>
<b>RESUMO GERAL .....</b>	<b>6</b>
<b>GENERAL ABSTRACT .....</b>	<b>7</b>
<b>SUMÁRIO.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>11</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
Geral.....	15
Objetivos Específicos .....	15
<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
<b>1. Obesidade .....</b>	<b>16</b>
<b>2. Obesidade e aspectos reprodutivos.....</b>	<b>19</b>
<b>3. Desenvolvimento Folicular e Ciclo Estral .....</b>	<b>23</b>
<b>4. Angiotensina II e Losartan.....</b>	<b>31</b>
<b>5. Modelos experimentais de Obesidade .....</b>	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>38</b>
<b>ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>48</b>
<b>ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>49</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>72</b>
Comitê de Ética para Experimentação Animal e Aulas Práticas.....	73
<b>ANEXO II .....</b>	<b>74</b>
Normas do periódico .....	75



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Ilustração do desenvolvimento folicular nos ovários

Figura 2 Variações hormonais no ciclo menstrual

Figura 3 Estágios do desenvolvimento folicular (Foliculogênese)

Figura 4 Variações hormonais no ciclo estral

Figura 5 Esfregaços vaginais de fêmeas de roedores em diferentes fases do ciclo estral

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ang II: Angiotensina II

AT1: Receptor de Ang II subtipo 1

AT2: Receptor de Ang II subtipo 2

CAF: Cafeteria

CTL: Controle

CEUA: Comitê de Ética do Uso de Animais

ECA: Enzima Conversora da Angiotensina

FIV: Fertilização *in vitro*

FSH: Hormônio Folículo Estimulante

GnRH: Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

ICSI: Injeção Intra Citoplasmática de Espermatozóides

IL-6: Interleucina-6

IMC: índice de Massa Corporal

LH: Hormônio Luteinizante

SHBG: Globulina Carreadora dos esteroides sexuais

SOP: Síndrome dos Ovários Policísticos

SRA: Sistema Renina-Angiotensina

TNF-alfa: Fator de Necrose Tumoral alfa

## INTRODUÇÃO GERAL

O conhecimento científico tenta compreender as diversas áreas do saber, como as Ciências Biológicas, as Ciências Humanas e as Ciências Tecnológicas, e estas, por sua vez, não devem ser analisadas por uma única visão, sendo que, segundo Goldman (1979), ter um olhar interdisciplinar sobre a realidade, permite que entendamos melhor a relação entre seu todo e as partes que a constituem. Para Japiassu (1976), a interdisciplinaridade caracteriza-se pela intensidade das trocas entre os especialistas e pelos graus de integração real das disciplinas no interior de um mesmo projeto (THIESEN, 2008). Dentro deste contexto, o planeta está cada vez mais interconectado, interdisciplinarizado e globalizado. A globalização tende a unificar todos os povos e países, tornando-os cada vez mais interdependentes, tanto em termos econômicos quanto socioculturais. Com a globalização adquiriu-se a tecnologia, e/ou vice-versa, com a intenção de melhorar a qualidade de vida e o bem-estar do ser humano. A tecnologia trouxe muitas facilidades, por meio de melhorias nos meios de comunicação como a internet, o telefone celular; melhoria nos meios de transporte como carros, aviões, trens, navios; melhorias no setor agropecuário; melhorias no setor industrial como no setor alimentício, enfim, não há dúvidas de que a vida no século XXI alcançou grandes avanços (VERASZTO et al., 2009).

Por outro lado, a tecnologia e a globalização trouxeram mudanças marcantes no estilo de vida das pessoas bem como no hábito alimentar. A alimentação de hoje é profundamente diferente daquela dos nossos antepassados, que viviam em contato com a natureza e dela se alimentavam, e vem sendo, ao longo do tempo, substituída pelos alimentos industrializados, com composição diferente, sendo mais palatáveis, porém, ricos em calorias e gorduras. Concomitantemente, o estilo de vida também sofreu grandes alterações em função da globalização e da tecnologia. Hoje, com os meios de transporte e os meios de comunicação existentes, facilitando a vida das pessoas, há maior comodidade do ser humano, e com isso, menor o gasto de energia e maior o sedentarismo (GARCIA, 2003).

As mudanças no estilo de vida e o sedentarismo, juntamente com uma susceptibilidade genética do indivíduo, têm sido apontados como as principais causas da obesidade, uma doença que toma proporções de epidemia mundial (OGDEN et al., 2007). Por ser multifatorial e desenvolver alterações em diversos órgãos e tecidos, a obesidade é um tema complexo que deve ser abordado de forma interdisciplinar pelas diversas áreas da saúde, como a medicina, a farmácia, a nutrição, a biologia, a enfermagem, a educação física, a fisioterapia, a psicologia, entre outras, para uma melhor compreensão desta doença como um todo. (BERNARDI, CICHELERO e VITOLO, 2005).

O número de obesos aumentou em muitos países. Aproximadamente 1,5 bilhões de indivíduos do mundo todo apresentam sobrepeso ou obesidade (OGDEN et al., 2012). A prevalência desta doença varia muito nas populações estudadas e está estimada em 5% nos países em desenvolvimento e em mais de 30% nos países desenvolvidos (LOPEZ et al., 2004). Nos Estados Unidos da América, 37,5% dos adultos estavam obesos, no período de 2009-2010 (OGDEN et al., 2012). No Brasil, 51% da população está com sobrepeso e 17% está obesa (BRASIL, 2012). Nas crianças e adolescentes a obesidade é atualmente um dos mais importantes problemas, visto que muitas das patologias adquiridas na infância tendem a se estender até a vida adulta (MILLER, ROSENBLOOM e SILVERSTEIN, 2004; OGDEN et al., 2012).

A obesidade gera um grande custo para o indivíduo, para a sociedade e para os governos. Dados dos Estados Unidos da América indicam que o custo com tratamento da obesidade e de suas complicações girou em torno de 147 bilhões de dólares em 2006, representando 10% dos gastos totais do país no cuidado da saúde (MORAN et al., 2011). No Brasil, dados da Força-Tarefa Latino-Americana de obesidade, indicam um gasto de mais de um bilhão de reais por ano pelo governo brasileiro com o tratamento da obesidade e de suas complicações, como consultas, exames, internamentos, medicamentos, sem contar com faltas no trabalho, licenças médicas e mortes precoces (FELIPPE e SANTOS, 2004).

Além dos já conhecidos efeitos nocivos da obesidade na função metabólica e cardiovascular, como o aumento da incidência de resistência à insulina, aumento do colesterol, aumento dos triglicerídeos, hipertensão arterial (DORRESTEIJN, VISSEREN e SPIERING, 2012), osteoartrites e também alguns tipos de câncer, muitos estudos têm mostrado a associação da obesidade com a disfunção reprodutiva (PASQUALI et al., 2003 ; PASQUALI, PATTON e GAMBIERI, 2007; BREWER e BALEN, 2010). Sagae et al. (2012) demonstraram que ratas submetidas a uma dieta rica em calorias, denominada dieta da cafeteria, apresentam associação entre a obesidade e a disfunção reprodutiva, incluindo a deficiência do pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante (LH), do hormônio folículo estimulante (FSH) e de progesterona.

A angiotensina II (Ang II) é um hormônio peptídeo bem conhecido na regulação do balanço do fluido vascular e nas funções cardiovasculares (FYHRQUIST e SAIJONMAA, 2008) e pode atuar na mediação dos efeitos da obesidade relacionada com disfunções reprodutivas nas fêmeas de roedores (SAGAE et al., 2012). Evidências clínicas e experimentais sugerem que o sistema renina-angiotensina (SRA) pode estar envolvido nas alterações fisiológicas relacionadas com a obesidade. De fato, a expressão do receptor AT1 da Ang II estava elevada no tecido adiposo de ratos obesos (PINTEROVA, KRIZANOVA e ZORAD, 2001) e o bloqueio do receptor AT1 reduziu a hiperglicemia e normalizou a concentração plasmática de insulina (HOENACK e ROESEN, 1996). Além disso, com o bloqueio do receptor AT1 da Ang II foi verificada a hipertrofia do tecido adiposo em ratos sem diabetes (ZORAD et al., 2006) e em diabéticos (TAKAHASHI et al., 2007).

Estudos prévios aos que demonstram a associação do SRA com a obesidade, mostraram a regulação de Ang II no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal em ratas (STEELE, GALLO e GANONG, 1983; STEELE, 1987), e observaram a liberação de secreção de LH pré-ovulatório após a injeção intracerebroventricular de Ang II (STEELE, MCCANN e NEGRO-VILAR, 1982; STEELE, GALLO e GANONG, 1985). A Ang II, por sua vez, potencializou a atividade da renina intrafolicular e aumentou a concentração

de Ang II no folículo pré-ovulatório de mulheres (LIGHTMAN et al., 1987). A ovulação e a maturação oocitária parecem ser estimuladas pela Ang II produzida nos ovários de coelhas (YOSHIMURA et al., 1997).

Sagae e colaboradores (2013), mostraram que ratas obesas por dieta de cafeteria não apresentaram o pico pré-ovulatório de LH e que a administração de losartan (um antagonista do receptor AT1 da Ang II) desde o desmame, restabeleceu este efeito nos animais.

Considerando que vários estudos têm correlacionado a obesidade com alterações na função reprodutiva, tanto em mulheres quanto em modelos animais;

Considerando que a Ang II parece ter um papel mediador nessa associação e que o bloqueio do receptor AT1 da Ang II administrado desde o desmame melhora o perfil reprodutivo;

Justifica-se estudar o desenvolvimento folicular de fêmeas adultas com obesidade induzida pela dieta de cafeteria, submetidas à administração do losartan, na vida adulta, na tentativa de responder a seguinte pergunta: o bloqueio do receptor AT1 da Ang II reduz as alterações na ovulação, observadas em ratas obesas quando administrado após a instalação da obesidade?

## OBJETIVOS

### Objetivo Geral:

Avaliar o efeito do tratamento com losartan, um antagonista do receptor AT1 da Ang II, no desenvolvimento folicular de ratas Wistar adultas, após a instalação da obesidade, induzida pela dieta de cafeteria.

### Objetivos Específicos

- Avaliar o peso corporal e os pesos das gorduras subcutânea, perigonadal e retroperitoneal dos animais;
- Analisar as fases do ciclo estral por meio de esfregaço vaginal;
- Realizar a contagem do número de folículos primários, secundários, antrais e maduros por ovário;
- Realizar a contagem do número de folículos atrésicos por ovário;
- Avaliar a medida do diâmetro dos folículos maduros;
- Avaliar a espessura da camada das células da teca interna e externa dos folículos maduros;
- Avaliar a presença ou ausência de cistos foliculares ou folículos do tipo III;
- Realizar a dosagem hormonal de FSH, LH, prolactina e progesterona.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1. Obesidade

A obesidade geralmente é definida como um excesso de gordura no corpo, porém a definição de excesso de gordura não é bem estabelecida. É difícil medir a gordura diretamente. Consequentemente, a obesidade é frequentemente definida como excesso de peso corporal e não como excesso de gordura, o que é calculado por meio do Índice de Massa Corporal ( $IMC = \text{peso (kg)} / \text{altura}^2$ ) (KEYS et al., 1972). A obesidade é definida também como um estado no qual o aumento do peso corporal, mais especificamente do tecido adiposo, é de suficiente magnitude para produzir consequências adversas à saúde, devido a um desequilíbrio-chave no balanço de energia, onde ocorre maior ingestão de energia (alimentação) em relação ao gasto (SPIEGELMAN e FLIER, 2001).

A obesidade é definida no adulto pelo IMC maior ou igual a 30 Kg/m<sup>2</sup> e, entre crianças e adolescentes, apesar de não existir uma padronização, alguns países definem sobrepeso ou obesidade quando o IMC para a idade estiver igual ou maior que o 95º percentil de uma população de referência especificada ou quando o IMC para a idade, baseado no escore do desvio-padrão (DP) - z-score -, for maior que +2 (WHO, 2000).

As taxas crescentes de obesidade são um desafio para a saúde pública mundial e constituem grande preocupação, pois têm alcançado proporções epidêmicas, sendo a obesidade um fator de risco para uma série de doenças crônicas como o diabetes tipo II, doença cardiovascular, doença hepática não alcoólica e câncer. A obesidade está relacionada com um modesto risco aumentado de todas as causas de mortalidade e também com a redução do tempo de vida (OGDEN et al., 2007), além de ocupar um significativo lugar nos sistemas de saúde e econômico (WITHROW e ALTER, 2011).

Há correlação da obesidade com maior risco de morte quando o IMC está acima de 30, tanto para homens como para mulheres, saudáveis e não



fumantes, em qualquer idade, bem como nos diferentes grupos étnicos ou raciais. E com a idade em torno de 50 anos, em pessoas que nunca fumaram, o risco de morte pode aumentar de 20 a 40% entre as pessoas com sobrepeso e de 2 a 3 vezes entre pessoas obesas, quando comparadas com as pessoas com peso normal. Sobrepeso também foi fortemente correlacionado com maior risco de morte em mulheres (ADAMS, SCHATZ e HARRIS, 2006).

A obesidade representa um significativo custo financeiro para o indivíduo, sociedade e governo. Dados dos Estados Unidos indicam que o tratamento da obesidade e de suas complicações girou em torno de 147 bilhões de dólares em 2006, representando 10% dos gastos totais do país no cuidado da saúde (MORAN et al., 2011). No Brasil, dados da Força-Tarefa Latino Americana, evidenciam que o Governo Brasileiro já gastou mais de um bilhão de reais por ano com consultas, exames, medicações, internamentos para pacientes com este problema de saúde (FELLIPPE e SANTOS, 2004).

Além dos fatores de risco associados com a obesidade (PHILLIPS et al., 2012), a qualidade de vida dos indivíduos obesos também está comprometida por estar associada à diminuição da atividade física, à baixa autoestima e depressão. Os obesos sofrem com o preconceito e até com a discriminação ou isolamento social, na sociedade em geral e nas relações interpessoais, provocado pela sensação de inadequação aos padrões vigentes atuais (TAVARES, NUNES e SANTOS, 2010).

Atualmente no Brasil, políticas de saúde pública tem dado ênfase no enfoque à prevenção da obesidade e das Doenças Crônicas Não Transmissíveis, para se tentar minimizar à longo prazo o efeito deletério da obesidade (CARVALHO, 2012).

A obesidade é considerada uma doença multifatorial. Parece haver uma interação genética-ambiental, onde indivíduos susceptíveis geneticamente, respondem a um ambiente mais urbanizado, com rápidas mudanças tecnológicas, com maiores opções de dietas ricas em gorduras e mais palatáveis; isso, somado ao fato das pessoas terem menor

oportunidade para gastar energia, com redução da atividade física (sedentarismo), e outros fatores como, psicológicos, fisiológicos e culturais, contribuem para a alta prevalência da obesidade (OGDEN et al., 2007).

Na obesidade existe uma disfunção do metabolismo do tecido adiposo e de seus componentes, podendo ocasionar um distúrbio metabólico importante, gerando a Síndrome Metabólica ou Síndrome X, onde se evidencia hiperglicemia, aumento da resistência à insulina, hiperinsulinemia, hipertensão arterial, aterosclerose, dislipidemia e diabetes tipo II, principalmente nos indivíduos que concentram a gordura na região abdominal ou central. Mulheres com obesidade central são mais propensas a desenvolverem a síndrome metabólica do que aquelas com obesidade menor na região abdominal ou com obesidade periférica (PEREIRA, FRANCISCHI e LANCHI, 2003).

A partir da década de 90, a relação da obesidade e suas comorbidades começou a ser melhor elucidada, o tecido adiposo deixou de ser considerado simplesmente como um local de armazenamento de ácidos graxos e passou a ter um papel fundamental no metabolismo dos lipídeos e da glicose, além de produzir uma série de substâncias denominadas adipocinas (THAYHURN, BING e WOOD, 2006). Dentre estas, a leptina, a interleucina-6 (IL-6), o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF-alfa), a adiponectina e o inibidor-1 da ativação do plasminogênio entre outros (HAJER et al., 2007).

Também é no tecido adiposo que ocorre a conversão periférica dos androgênios em estrogênios, provenientes basicamente dos ovários, pela ação da enzima aromatase. Este processo fisiológico é dependente da quantidade de tecido adiposo. Na obesidade, como o tecido adiposo está aumentado, ocorre uma grande conversão dos andrógenos em estrógenos e esse aumento de estrógenos circulantes sinaliza para o hipotálamo (retroalimentação positiva) liberando mais LH, o que pode alterar o perfil reprodutivo (PASQUALI e GAMBIERI, 2006).

## **2. Obesidade e aspectos reprodutivos**

Muitos estudos têm correlacionado a obesidade com infertilidade (MORAN et al, 2011; BRANNIAN, 2011), porém, os mecanismos envolvidos não estão bem estabelecidos. Tem sido muito correlacionada com alterações da ovulação, principalmente associada à Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP), uma síndrome caracterizada por hiperandrogenismo (clínico e ou bioquímico), aspecto policísticos dos ovários à ultra-sonografia, oligo ou anovulação (irregularidade menstrual), e geralmente está associada a outros fatores como obesidade, hipersecreção de LH e resistência à insulina (ROTTERDAM, 2004), e estas mulheres apresentam-se mais subférteis (BREWER e BALEN., 2010; MOTTA, 2012).

Em torno de 50% das mulheres com SOP são obesas ou com sobrepeso, e a maioria destas, apresentam aumento maior da gordura visceral do que subcutânea, perfazendo um aspecto androide da distribuição da gordura (obesidade central). E em torno de 80% das mulheres com SOP apresentam resistência à insulina (BOHLER, SRIPRAKASH e WINTERS, 2010).

A SOP está associada com piora do metabolismo da insulina, ocasionando hipersecreção de insulina, hiperglicemia e manifestações clínicas de resistência à insulina (GAMBIERI et al., 2002). A resistência à insulina e a hiperinsulinemia aumentam a produção de andrógenos, resultando em infertilidade ovulatória (BHATHENA, 2011). Em ratas submetidas à dieta que induz obesidade também se evidenciou infertilidade, e observou-se nessas ratas que a sensibilidade à insulina na hipófise e nos ovários permaneceu presente, com resistência à ação da insulina nos outros órgãos, o que contribui para a fisiopatologia da SOP (WU et al., 2012). Numerosos estudos têm mostrado a presença de resistência à insulina e aumentada prevalência de fatores de risco para doença cardiovascular e diabetes em mulheres com SOP (PAULI et al., 2011).

Na obesidade abdominal, desenvolve-se resistência à insulina e ocorre uma hiperinsulinemia; entretanto, o ovário permanece responsivo à insulina. Elevadas concentrações de insulina aumentam a esteroidogênese ovariana e

consequente produção excessiva de andrógenos pelas células da teca (DUNAIF, 1997). Produção elevada de andrógenos ovarianos leva a atresia prematura do folículo e, conseqüentemente, aumenta a chance de oligo/anovulação (DUNAIF, 1997; PASQUALI e GAMBIERI, 2006; NORMAN et al., 2007). Produção excessiva acíclica de estrogênios pode exercer um *feedback* positivo na regulação da liberação do LH e um *feedback* negativo na liberação de FSH, levando a um aumento na produção de androgênio pelos ovários (GAMBIERI et al., 2002).

Mulheres com SOP apresentam alterações nas secreções de LH, tanto na frequência quanto na amplitude, tendo concentrações maiores de LH bem como da relação LH/FSH do que mulheres consideradas sem SOP, podendo-se atribuir a hipótese de existir um defeito na secreção de hormônio liberador de LH pelo hipotálamo (TAYLOR et al., 1997).

O impacto negativo da obesidade no desenvolvimento folicular é complexo e multifatorial, estando relacionado com alterações hormonais (PASQUALI et al., 2003).

O tipo de distribuição do tecido adiposo também influencia as concentrações da globulina carreadora de esteroides (SHBG), produzida pelo fígado e com alta afinidade pela testosterona e baixa afinidade pelo estradiol, e mulheres com gordura central ou abdominal possuem menor concentração de SHBG do que as mulheres com obesidade periférica, o que eleva as concentrações de testosterona e estradiol. A retroalimentação negativa do excesso de estrogênio pode reduzir a sinalização hipotálamo-hipófise e alterar o processo fisiológico da ovulação (GOSMAN, HEATHER e LEGRO, 2006). Geralmente mulheres obesas com gordura central têm altas concentrações de insulina o que leva a uma diminuição na produção da SHBG pelo fígado, e causa, conseqüentemente, um aumento das concentrações dos hormônios esteroides sexuais livres circulantes como a testosterona, deidrotestosterona e androstenediona de origem ovariana. Este aumento dos androgênios circulantes (hiperandrogenismo), e de insulina tendem a ser responsáveis pela deposição de gordura, principalmente central

(GAMBIERI et al., 2002), isto poderia formar um ciclo vicioso perpetuando o estado de obesidade central em mulheres com SOP (LIMM et al., 2012).

Um estudo sobre a distribuição de gordura corporal de mulheres anovulatórias evidenciou que a gordura abdominal está aumentada devido a um aumento significativo da gordura subcutânea (abdominal e de tronco) e não tanto da gordura intra-abdominal, o que se correlacionou mais com anovulação (KUCHENBECKER et al., 2010).

Mulheres obesas sofrem de perturbações do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, distúrbios menstruais e tem três vezes mais chance de sofrer de oligo/anovulação. Um fino balanço hormonal regula o desenvolvimento folicular e a maturação oocitária, e tem sido observado que a obesidade pode alterar o ambiente hormonal, levando a anovulação associada à SOP. A leptina, um hormônio produzido pelos adipócitos, está elevado em mulheres obesas e leptina aumentada está associada com piora da fecundidade (BREWER e BALEN, 2010).

Um IMC alto está relacionado com aumento nas concentrações de leptina no fluido folicular e no plasma, e diminuição da concentração de adiponectina sérica. A chance de uma mulher obesa conceber, diminui à medida que seu IMC aumenta. Mulheres com IMC entre 30 e 35 tinham uma diminuição de 4% nas taxas de concepção para cada unidade de aumento no IMC (STHEPHENSON, 2008).

Mulheres obesas sofrem mais de alterações do ciclo menstrual, piora da ovulação, com conseqüente efeito negativo sobre o endométrio e implantação. Também ocorre piora da resposta destas mulheres obesas aos tratamentos de reprodução assistida, bem como nas taxas de fertilização, implantação e concepção, devido à piora na qualidade oocitária e/ou defeitos na receptividade endometrial (PENZIAS, 2012; BELLVER et al., 2013)) e também menor número de oócitos maduros (em metáfase II) (DOKRAS et al., 2006; WITTEMER et al., 2000) pode levar a maiores taxas de abortamentos e perdas gestacionais precoces (ROBKER, 2008). Os mecanismos como a obesidade reduz as taxas de gravidez são complexos e parecem

multifatoriais. A resistência à insulina parece ser o fator chave para a anovulação induzida pela obesidade (NORMAN, 2010).

A prevalência da obesidade durante a gravidez também está aumentando e além das complicações em curto prazo da obesidade durante a gravidez, em mãe e feto, é agora bem reconhecido que a obesidade materna tem consequências adversas em longo prazo para a saúde da prole. Evidências de estudos com animais e humanos indicam que a obesidade materna aumenta o risco da prole desenvolver obesidade e alterar a composição corporal na infância ou adulto e isso adicionalmente tem impacto na saúde cardiometabólica da prole com alteração da regulação do metabolismo incluindo glicose/insulina e desenvolvimento de hipertensão e disfunção vascular (DRAKE e REYNOLDS, 2010).

Mulheres obesas submetidas à estimulação da ovulação com gonadotrofinas para ciclo de Fertilização *in vitro* (FIV) e Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI), apresentaram menor número de oócitos por ciclo e menos oócitos maduros (em metáfase II), em comparação com mulheres com IMC normal, sugerindo que a obesidade pode, independentemente, ser um fator de piora da maturação oocitária (DOKRAS et al., 2006; WITTEMER et al., 2000). A obesidade tem um significativo efeito negativo sobre os resultados dos tratamentos de reprodução assistida, sendo que mulheres com um IMC maior que 30 tem 68% de taxas mais baixas de ter um nascido-vivo após uma primeira tentativa de Fertilização *in vitro*, comparadas com mulheres com IMC menor que 30 (MORAGIANNI, JONES e RYLEY, 2012). Estima-se que mulheres com sobrepeso e obesas com infertilidade tenham uma diminuição em torno de 15% de ter um nascido vivo em comparação com mulheres de peso normal, além de terem maiores chances de complicações na gestação e foi estimado um custo por nascido-vivo 54% maior nas pacientes com sobrepeso e de 100% maior nas obesas quando comparadas com mulheres de peso normal (KONING et al., 2010).

Redução na maturação da idade sexual, início mais precoce da puberdade, com antecipação da menarca, tem sido observada tanto em mulheres como em fêmeas de roedores, associadas a IMC mais elevado (WANG, 2002; SAGAE et al., 2012).

O ovário é considerado um órgão-alvo da insulina, visto através da habilidade da insulina estimular a esteroidogênese em células ovarianas *in vitro* e pela detecção de receptor de insulina nos compartimentos estromal e folicular. Portanto, a insulina tem papel importante na regulação da esteroidogênese ovariana, desenvolvimento folicular e proliferação das células da granulosa e as alterações na sinalização intracelular da insulina podem ter um papel no estado infértil associado com a obesidade. Ratas obesas por dieta hipercalórica apresentam resistência à insulina nos ovários (AKAMINE et al., 2010).

A Infertilidade associada à obesidade e hiperandrogenismo são corrigidas pela deleção do receptor de insulina em células da teca ovariana em camundongos, onde fêmeas magras com deleção do receptor de insulina não apresentaram alterações no desenvolvimento ou função reprodutiva, enquanto que fêmeas com obesidade induzida por dieta com alto teor de gordura e sem a deleção, apresentaram infertilidade e altas concentrações circulantes de testosterona; e as obesas com a deleção, apresentaram fertilidade e concentrações de testosterona semelhantes aos controles, sugerindo uma ligação entre hiperinsulinismo e hiperandrogenismo ovariano e infertilidade (WU et al., 2014).

### **3. Desenvolvimento Folicular e Ciclo Estral**

As mulheres e as fêmeas de roedores possuem dois ovários, os quais têm a função de formar o oócito (gameta feminino), capaz de ser fertilizado, e de produzir hormônios esteroides femininos (estrogênio e progesterona) com a finalidade de preparar todo o sistema reprodutivo e o corpo feminino para a fertilização e a subsequente gestação. No interior dos ovários encontram-se os folículos, que são suas unidades morfofuncionais, formados por um oócito envolvido pela camada de células da granulosa (OKTEM e OKTAY, 2008).

Os ovários consistem de três porções principais: a cortical, a qual possui uma camada mais externa, com uma única camada de células cuboides, que é o epitélio germinativo. Logo abaixo do epitélio germinativo, na camada mais interna da cortical, encontram-se os folículos, embebidos em um tecido estromal (tecido conjuntivo e células intersticiais). Os folículos estão em várias fases de desenvolvimento ou regressão, indo de primordial, passando por primário e secundário, depois para pré-antral, antral, pré-ovulatório (maduro). Alguns folículos se apresentam atresícos e outros em fase de corpo lúteo (pós-ovulação). Ainda tem a camada medular e o hilo (rede *testis*) onde se encontram os vasos, os nervos e as células hilares (SPEROFF e FRITZ, 2005), figura 1.

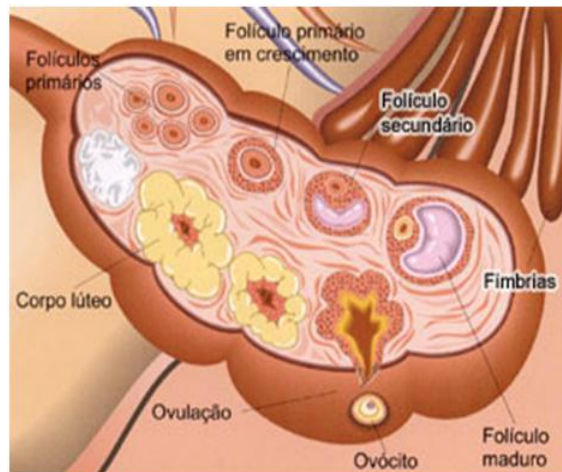


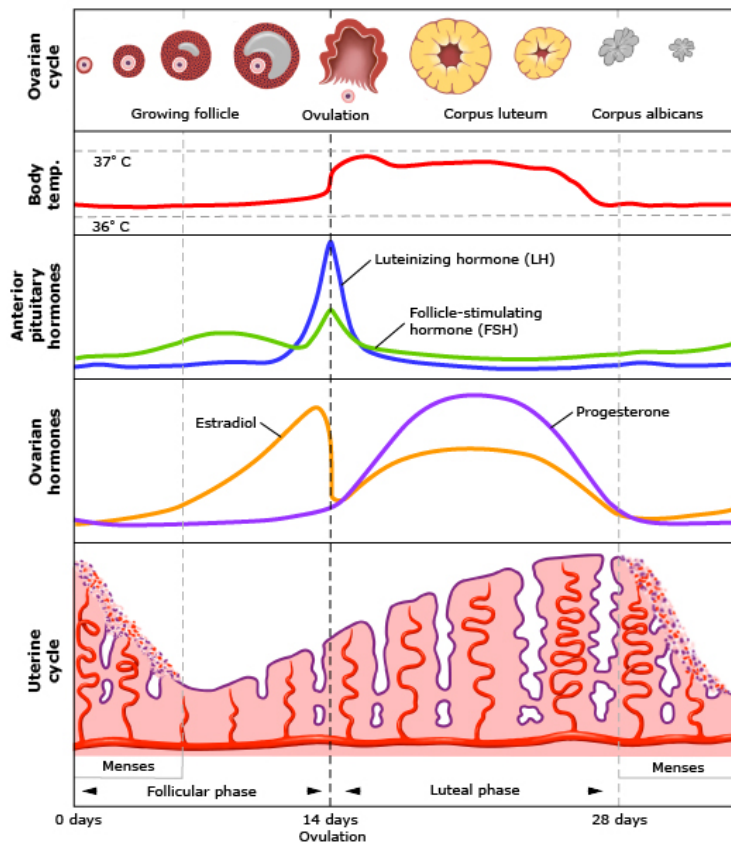
Figura 1: Ilustração do desenvolvimento folicular no ovário  
(SPEROFF e FRITZ, 2005)

A produção dos folículos, nas mulheres, se faz somente na vida embrionária, inicia-se por volta da décima segunda semana, com um pico por volta da vigésima semana (em torno de 6-7 milhões), sendo que ao nascimento a menina possui em torno de 1 a 2 milhões de folículos. Chegando à puberdade, possui em torno de 300.000 folículos, que serão utilizados em toda a sua vida reprodutiva, sendo que em torno de 1.000 folículos são recrutados em cada ciclo menstrual, sofrerão alterações e evoluirão ou para apoptose (atresia) ou para apenas um ser o dominante e liberar o oócito maduro. E em toda a vida reprodutiva da mulher, somente em



torno de 400 a 500 folículos terão se tornado pré-ovulatórios (SPEROFF e FRITZ, 2005).

Durante cada ciclo menstrual, o desenvolvimento folicular é dependente de um padrão de liberação das gonadotrofinas, LH e FSH, pelo Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRh) hipotalâmico, e dos esteroides, estrogênio e progesterona, que vão culminar com a ovulação e posterior formação do corpo lúteo (SPEROFF e FRITZ, 2005), figura 2.

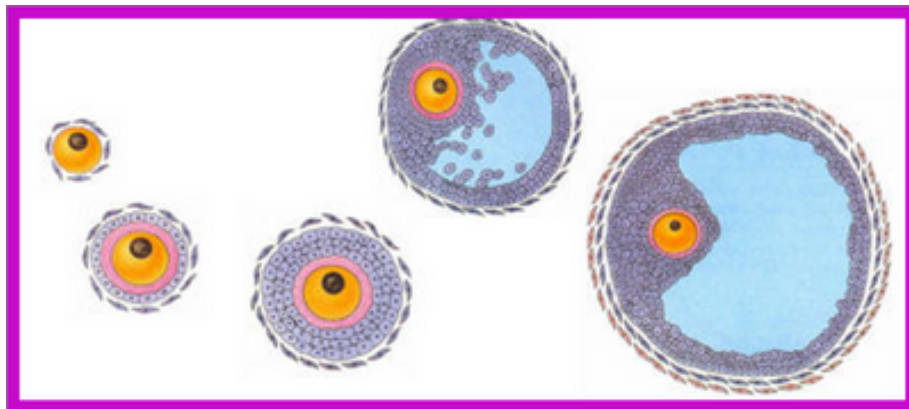


[http://drasilviasouza.files.wordpress.com/2011/08/menstrual\\_cycle.jpg](http://drasilviasouza.files.wordpress.com/2011/08/menstrual_cycle.jpg)

Figura 2: Figura esquemática da variação hormonal no ciclo menstrual

A foliculogênese (figura 3), processo no qual um folículo primordial, constituído de uma pequena célula e uma lâmina de células foliculares achatadas, cresce e diferencia-se em um folículo primário, depois em folículo secundário, antral e maduro, onde o oócito amadurece e é liberado no processo de ovulação. Os folículos maduros contêm um oócito maduro e várias camadas de células da granulosa, que são envolvidas pelas células da

teca. O folículo primordial passa a folículo primário e secundário, depois forma a cavidade antral e passa a ser chamado de folículo antral, e posteriormente, denomina-se folículo maduro, tornando-se o folículo pré-ovulatório. Esse crescimento, basicamente, inicia-se quando as concentrações de estrogênio estão baixas e sinalizam para o hipotálamo liberar o GnRH, que age na hipófise liberando o FSH, que estimula o crescimento dos folículos nos ovários (SILVA, FIGUEIREDO, VAN DER HURK, 2009), figura 3.



Da esquerda para a direita: Folículo primordial, primário, secundário, antral e maduro.

<http://aprenderbiologiacomapaulaeasuzi.blogspot.com.br/2009/10/evolucao-folicular-em-cada-ciclo.html>

Figura 3: Estágios do desenvolvimento folicular (Foliculogênese)

A síntese de esteroides (esteroidogênese), ou seja, de estrógeno e progesterona, nos ovários, ocorre predominantemente nas camadas de células da granulosa e da teca dos folículos. A porção interna da teca é altamente vascularizada, e produz grande quantidade de progesterona e andrógenos, os quais atuam como precursores para a síntese de estrógenos nas células da granulosa. A androstenediona e a testosterona se difundem para as células da granulosa, onde são convertidas principalmente em estradiol, pela ação da enzima aromatase (MINDNICH, MÖLLER e ADAMSKI, 2004). No estágio de folículo pré-ovulatório, durante a maturação folicular, a síntese de estradiol é gradualmente aumentada devido ao *up-regulation* da aromatase por ação do LH e FSH. Durante esta fase, o

estrógeno parece ser responsável por aumentar os receptores de LH e iniciar a alça de retroalimentação positiva responsável pelo pico de LH que resulta no principal estímulo para ocorrer a ovulação (GREENWALD e ROY, 1994). Após o pico de LH e, conseqüente, ovulação, o folículo entra em fase lútea na qual predomina a síntese de progesterona.

O desenvolvimento folicular nas fêmeas de roedores é muito semelhante ao de humanas, sendo por este motivo, o modelo animal mais utilizado. Uma diferença em relação à formação dos folículos primordiais é que nas mulheres estes folículos estão presentes desde a vigésima semana de vida fetal, e nas fêmeas de roedores formam-se nos primeiros três dias de vida após o nascimento. E em relação ao recrutamento e seleção do folículo antral, os mecanismos são semelhantes entre as fêmeas de roedores e primatas, entretanto, em roedores, múltiplos folículos tornam-se dominantes a cada ciclo estral, portanto, o processo de ovulação é de vários oócitos por ciclo (HIRSHFIELD, 1991) enquanto na mulher, normalmente, somente um torna-se dominante para ovular.

O ciclo reprodutivo das ratas é chamado de ciclo estral e é caracterizado por quatro fases: proestro, estro, metaestro (ou diestro I) e diestro (ou diestro II) (FREEMAN, 1994; SANTORO et al., 2004). A ovulação ocorre do início do proestro até o fim do estro. A duração do ciclo é em média de quatro dias e isso faz com que sejam animais ideais para investigação das mudanças que ocorrem durante o ciclo reprodutivo (MARCONDES, BIANCHI e TANNO, 2002). A fase proestro tem duração de 12 a 14 horas e antecede o estro, o qual tem duração de 25 a 27 horas, e é a fase em que ocorre a ovulação. O metaestro ou diestro I dura em torno de 6 a 8 horas e o diestro II, 55 a 57 horas (SANTORO et al., 2004).

Durante o ciclo estral, a prolactina, o LH e o FSH permanecem baixos e aumentam na tarde do proestro. As concentrações de estradiol começam a aumentar no metaestro, alcançando concentrações de pico durante o proestro e retornando para a linha de base no estro. A secreção de progesterona também aumenta durante o metaestro e diestro, diminuindo

logo após para depois alcançar seu segundo pico por volta do fim do proestro (SMITH, 1999) Figura 4.

O aumento do estrógeno induz um aumento na secreção de gonadotrofinas na tarde do proestro (FREEMAN, 1994). A secreção de LH, FSH e Prolactina são similares durante a maior parte do ciclo estral, com suas concentrações permanecendo baixas e não sendo modificadas até a tarde e início da noite do proestro. O pico plasmático de LH, importante para o processo ovulatório, ocorre entre às 15h e 18 h do proestro; e o pico da prolactina ocorre às 15 h do proestro. As concentrações de FSH e prolactina apresentam um pico secundário no estro, diferente do LH, e isto pode estar relacionado com o recrutamento de folículos para o próximo ciclo e com a função luteotrófica (SZAWKA e ANSELMO- FRANCI, 2004). Figura 4.

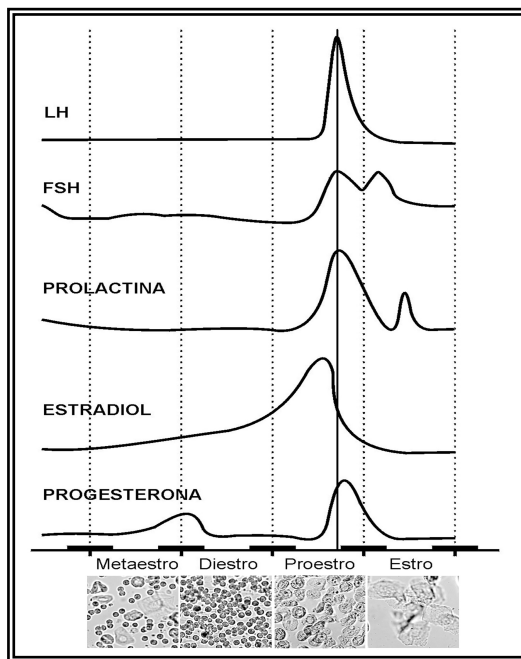


Figura 4: Variações hormonais no ciclo estral

O desenvolvimento dos folículos nos ovários depende da integridade do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, sendo que o FSH produzido pela hipófise vai atuar nas células da granulosa dos folículos promovendo seu crescimento. Estas células, por sua vez, produzem estrogênio e desenvolvem receptores para o LH. Este estrogênio aumentado induz a liberação pela

hipófise do pico pré-ovulatório de LH que promove a maturação do oócito e a, consequente, ovulação. (BROEKMANS et al., 2010).

A caracterização de cada fase se faz de maneira rápida e fácil através da citologia vaginal, coletada através de lavados vaginais diariamente pela manhã, com auxílio de uma pipeta plástica com 10 microlitros de soro fisiológico (NaCl à 0,9%), inserindo a ponta da pipeta na vagina da rata, mas não profundamente. Instila-se o soro fisiológico uma ou duas vezes dentro da vagina e se faz uma lâmina com esse fluido vaginal de cada animal. O material não precisa ser fixado e é observado à fresco num microscópio de luz com objetivas de 10 e 40 X (MARCONDES, BIANCHI e TANNO, 2002), Figura 5.

Três tipos de células podem ser identificadas no lavado vaginal: células epiteliais (redondas e nucleadas), células corneificadas (irregulares e sem núcleo) e leucócitos (redondas e bem pequenas). A proporção entre elas é o método usado para determinação da fase do ciclo estral. Fase de proestro: predomínio de células epiteliais; Fase estro: predomínio de células corneificadas; Fase metaestro, consiste da mesma proporção entre leucócitos, células epiteliais e células corneificadas e Fase de diestro: predomínio de leucócitos. Essa variação se deve às mudanças nas concentrações de estradiol e progesterona durante o ciclo, sendo que a presença de células epiteliais evidencia a presença de estradiol, células corneificadas são condizentes com o pico de estradiol na fase ovulatória. No diestro I observa-se poucas células epiteliais e corneificadas, com leucócitos, e na fase diestro II, grande quantidade de leucócitos (MARCONDES, BIANCHI e TANNO, 2002) Figura 5.

O conhecimento atual sobre o ciclo ovariano de mamíferos que ovulam espontaneamente baseia-se, sobretudo, em estudos realizados em ratas, visto que muitas similaridades são encontradas entre o ciclo da mulher e da rata: ovulam cíclica e espontaneamente, independente de alterações sazonais ou de atividade sexual. Entretanto, existem algumas diferenças: na mulher o marco do ciclo menstrual é a menstruação e na rata é a ovulação,

caracterizado pela receptividade sexual; após a ovulação nas ratas, o corpo lúteo tem breve duração, não secretando progesterona em quantidades suficientes para permitir a implantação do embrião, ao menos que a cópula tenha acontecido no estro (ANTUNES-RODRIGUES, 2005).

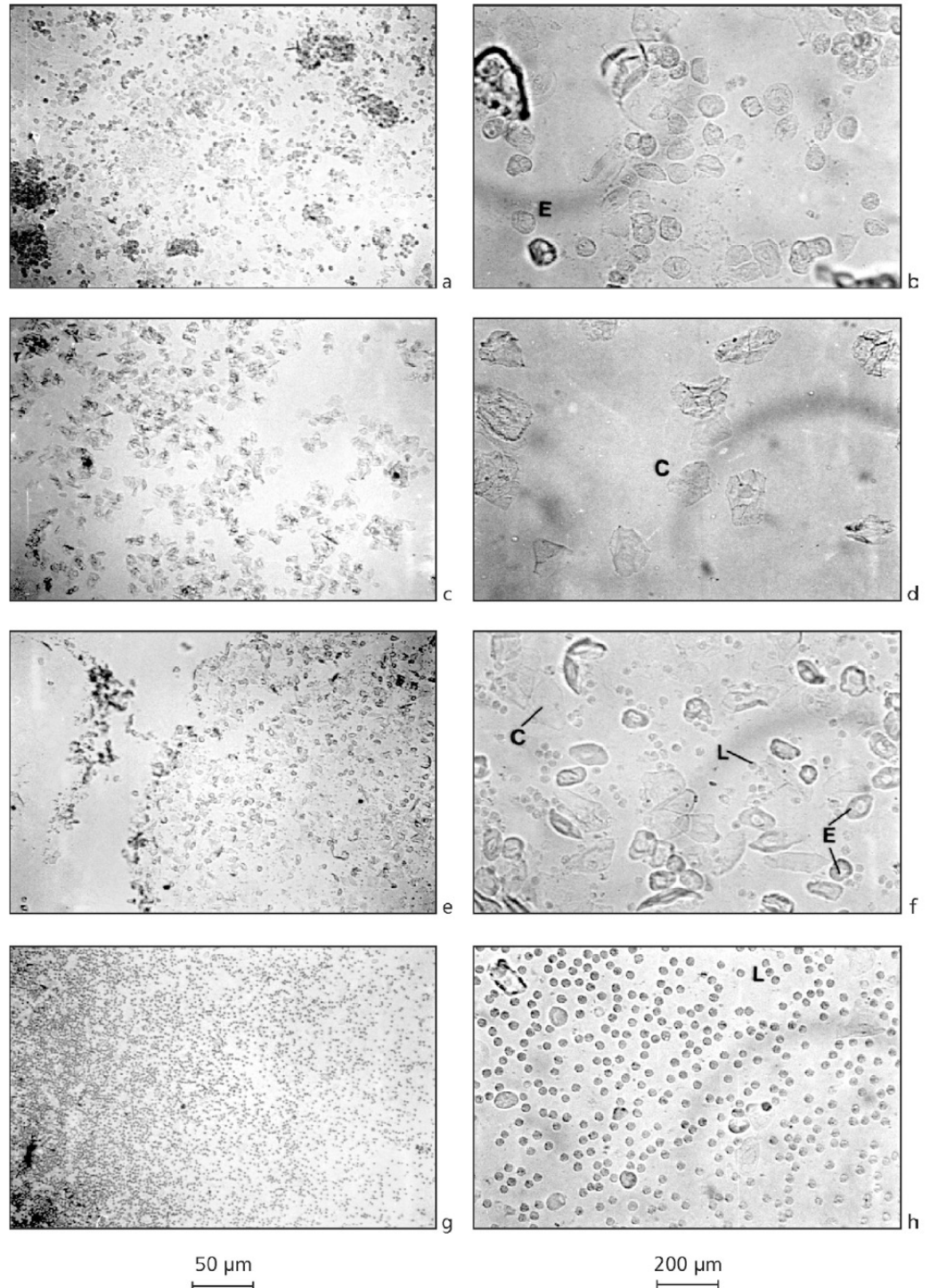


Figura 5: Fotomicrografias, com aumentos de 10 e 40 X, de esfregaços vaginais de fêmeas de roedores nas diferentes fases do ciclo estral: a e b) proestro (predomínio de células epiteliais – E); c e d) estro (predomínio de células corneificadas – C); e e f) diestro I (células epiteliais, corneificadas e leucócitos); g e h) diestro II (predomínio de leucócitos – L).

(MARCONDES, BIANCHI e TANNO et al., 2002)

#### 4. Angiotensina II e Losartan

Primeiramente, a renina foi descoberta por Tigerstedt and Bergman, em 1898, onde observaram o aumento da pressão arterial após injetarem um substrato de rim em cobaias, e o efeito foi maior nas nefrectomizadas. Posteriormente, a Ang II foi caracterizada por Braun-Menendez, em 1940, onde demonstrou que a renina produzia seu efeito na pressão sanguínea por meio da ação de um substrato no plasma (renina) que causava a formação de uma substância pressora (Ang II). E na sequência, um completo sistema periférico para a formação e metabolismo da Ang II foi logo caracterizado e chamado de Sistema Renina-Angiotensina (SRA), por volta de 1976. Neste sistema clássico, uma molécula precursora chamada angiotensinogênio, proveniente do fígado, é clivado pela ação de uma enzima sintetizada e liberada na circulação principalmente pelas células justa-glomerulares renais, chamada renina, dando origem a Angiotensina I, um decapeptídeo que, por sua vez, é inativa e se converte em Angiotensina II, um octapeptídeo efetor, por meio da ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), nos vasos sanguíneos pulmonares (MORGAN, PIPKIN e KALSHEKER, 1996).

O conceito mais antigo e conhecido do SRA é de que a Ang II circulante age nos seus receptores localizados em algumas partes, como na musculatura lisa dos vasos sanguíneos, na adrenal e nos rins, onde produz vasoconstrição, libera aldosterona e retém sódio, respectivamente, tendo importante ação no balanço hidroeletrolítico e na regulação da pressão arterial (PAGE, 1987; THATCHERS et al., 2009).

Estudos na década de 60, sugeriram que existia um mecanismo em que a Ang II circulante tinha uma ação sobre o sistema nervoso central, por meio de receptores, tendo um papel importante no controle cardiovascular e balanço hidroeletrolítico (BICKERTON e BUCKLEY, 1961; FITZSIMON,

1980). Nos últimos 40-50 anos muito se pesquisou sobre o SRA, e seus componentes foram encontrados em outros tecidos além da parede arterial, rins e adrenal; como coração, hipotálamo, hipófise e gônadas. A clássica visão endócrina do SRA mudou e um novo conceito surgiu. Em adição ao tradicional sistema, ou modo endócrino de ação, a ANG II tem efeitos no tecido local (parácrina), nas células adjacentes (autócrina) e possíveis eventos intracelulares (intrácrina) (INAGAMI et al., 1988). Concomitantemente, concluíram que existia um SRA central, que secretava renina e angiotensina (PHILLIPS, 1987) e que a Ang II central era influenciada pela Ang II periférica, por hormônios como estrogênio e corticoides, pelo sistema autonômico periférico, e pela concentração do volume de fluido extracelular e composição iônica do plasma. Há inter-relações mútuas entre hormônios hipofisários e Ang II periférica e sistemas autonômicos, sendo que a Ang II é parte de um sistema regulatório múltiplo (SAAVEDRA, 1992). Em outro estudo, a Ang II foi administrada centralmente em fêmeas de roedores e observou-se que pode controlar a liberação de prolactina (PRL). A Ang II inibiu a secreção de PRL através da estimulação do sistema dopaminérgico e isto é dependente do estrogênio (STEELE, MCCANN e NEGRO-VILAR, 1982).

A Ang II modula a liberação de vários hormônios na hipófise anterior e posterior e também modula a formação e liberação de fatores liberadores hipotalâmicos que chegam até a hipófise pela circulação, onde agem diretamente, como foi demonstrado em um estudo no qual foi injetado Ang II intracerebral em fêmeas de roedores e houve maior liberação de LH e menor liberação de PRL em ratas ovariectomizadas tratadas com estrogênio (STEELE, GALLO E GANONG, 1985; DORNELES e FRANCI, 1998). Porém a injeção periférica de Ang II não alterou as concentrações de LH, sugerindo que o efeito de liberação de LH é mediado por receptores cerebrais de Ang II e não pela Ang II circulante (STEELE, 1987). Após a injeção periférica de angiotensina II observou-se a presença de receptores para Ang II na região cerebral através de autorradiografia do cérebro dos ratos (VAN HOUTEN et al., 1980). Depois, o método foi substituído pelos métodos quantitativos



(ISRAEL, PLUNKETT e SAAVEDRA, 1985). E hoje são realizados por métodos de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) *in real time* (LOUIS, SAWARD e Zahradka, 2011). A partir disso, foram identificados, farmacologicamente, dois subtipos de receptores da Ang II, chamados AT1 e AT2 (WHITEBREAD et al., 1989). Os AT1 são encontrados nos vasos sanguíneos, nos rins, na adrenal, fígado e pulmões e antagonizam os efeitos da Ang II. Os AT2 estão presentes nos tecidos embrionários e sofrem uma grande redução após o nascimento, mas parecem antagonizar as ações dos receptores AT1 (GOOSSENS, MCQUAID e DENNIS, 2006).

O derivado imidazólico losartan (DuP 753) é o antagonista do receptor AT1 da Ang II que foi melhor caracterizado (WONG et al., 1990). Foi descoberto, na década de 80, por cientistas da companhia DuPont e posteriormente foi desenvolvido pela Merck. É um não peptídeo, que bloqueia a ação da Ang II na célula, impedindo seus efeitos (DUNCIA et al., 1990). Os receptores AT2 são expressos em altas concentrações nos tecidos fetais, mas rapidamente diminuem após o nascimento e são bloqueados pelas tetraimidazopiridinas como o PD123177 e PD 123319 (BUMPUS et al., 1991). Posteriormente, além de existir receptores AT1 e AT2 periféricos, detectou-se a presença dos receptores da Ang II, AT1 e AT2, nas regiões do cérebro (SONG et al., 1991). As funções cerebrais da hipófise são mediadas pelos receptores do tipo AT1 de Ang II (SAAVEDRA, 1992).

Os receptores AT1 foram bem descritos na década de 90, por Inagami. São receptores de membrana acoplados à proteína G e exercem seus efeitos através da ativação de vias de sinalização intracelular ativando a proteína Gq, que estimula a fosfolipase. A fosfolipase C beta uma vez ativada, induz a formação de trifosfato de inositol, assim como de diacilglicerol, o que provoca a liberação e aumento da concentração citoplasmática de cálcio, levando à ativação da proteína quinase C e da adenilciclase regulada pelo receptor AT1 (INAGAMI, 2004). Além de ativar a sinalização associada à proteína G a Ang II, através de seu receptor AT1, é capaz de induzir uma cascata de ativação das vias tirosinas-quinases, que regulam vias efetoras intracelulares como PLC-gama, Ras-Raf-MAPK quinase (MEK)-ERK e *signal transducers and*

*activator of transcription* (STATs) e ativando a via serina-quinase, inibindo a sinalização de insulina pela via IRb-beta/IRS-1/PI-3 quinase, que acabam por aumentar a resistência à insulina intracelular (CARVALHO et al., 2007; LUTHER e BROWN, 2011).

Os receptores AT2 da Ang II também são receptores de membrana acoplados à proteína G, mas a ativação do mecanismo de ação intracelular é diferente do AT1 e ainda é controverso. Parece que ativa a fosfatase de serina/treonina PP2A, que direciona o sinal para o controle da atividade de canais de potássio e cálcio e parece também regular negativamente a ativação da cascata MAP quinase desencadeada pela ativação do AT1 (CARVALHO et al., 2007).

A Ang II e os componentes do SRA estão aumentados na obesidade, em função da maior produção pelo adipócito, tendo um grande impacto no metabolismo lipídico e dos carboidratos, tendo um papel no desenvolvimento da resistência à insulina associada com o aumento da pressão arterial (STRAZZULLO e GALLETTI, 2004). Também evidenciou-se que a Ang II produzida localmente, estimula a liberação de leptina pelos adipócitos em fêmeas de roedores (CASSIS et al., 2004). E a infusão de Ang II diminuiu a adiponectina plasmática via receptor AT1 em ratos, tendo implicação na resistência à insulina relacionada à hipertensão (RAN et al., 2006). O bloqueio do receptor AT1 atenua a resistência à insulina e a remodelação miocárdica em ratos com obesidade induzida por dieta hipercalórica (OLIVEIRA-JUNIOR et al., 2014)

Foi demonstrada a presença dos componentes do SRA no ovário tendo um papel importante na fisiologia ovariana bem como no desenvolvimento folicular, esteroidogênese, maturação oocitária, ovulação e atresia folicular; e que a expressão do SRA no ovário é dependente das gonadotrofinas. A Ang II tem importantes efeitos em diferentes estágios do ciclo reprodutivo, modula a esteroidogênese e formação do corpo lúteo e estimula a maturação oocitária e a ovulação via receptores de Ang II nos folículos. Qualquer distúrbio no SRA ovariano pode resultar em desordens reprodutivas como

SOP, Síndrome de Hiperestímulo Ovariano, tumores ovarianos e gravidez ectópica (YOSHIMURA, 1997).

Atualmente, já foram descobertas outras angiotensinas (III, IV ) e sabe-se que o SRA está além daquele classicamente “circulante”, pois existem outros SRA “locais”, presentes em vários tecidos, inclusive tecido adiposo e nos ovários (FYHRQUIST e SAIJONMAA, 2008).

Resultados recentes do nosso grupo de pesquisa evidenciaram que a administração intraperitoneal de losartan, o antagonista do receptor AT1 da Angiotensina II, desde o desmame, preveniu a ausência do pico pré-ovulatório e a redução da ovulação em ratas tratadas com uma dieta para indução da obesidade, denominada dieta da cafeteria (SAGAE et al, 2012 e 2013). Também demonstrou-se melhora na secreção de prolactina em fêmeas lactantes submetidas ao stress com a injeção do antagonista do receptor de AT1 no núcleo arqueado hipotalâmico de ratas lactantes ooforectomizadas (DONADIO et al., 2004). Isso denota que a Ang II possa ter um papel na fisiopatologia da piora do aspecto reprodutivo na obesidade.

Há trabalhos na literatura demonstrando melhora da tolerância à glicose e da resistência à insulina com o uso do antagonista do receptor AT1 da Ang II, tanto em modelos de roedores de diabetes tipo II como em humanos para prevenir diabete mellitus (CHU et al., 2006; McGUIRE et al.,2008 ). Como a obesidade está associada com resistência à insulina, e a síndrome dos ovários policísticos está relacionada com a obesidade e resistência à insulina, e já foi evidenciado resistência à insulina nos ovários (AKAMINE et al., 2010), provavelmente pode existir um elo entre resistência à insulina e o SRA, onde este pode interagir com a sinalização intracelular de insulina. Isto fica evidenciado em trabalhos publicados que demonstram que o receptor de membrana celular AT1 da Ang II é um tipo de receptor de membrana acoplado a Proteína G, e que a Ang II, assim como a insulina, ativam a fosforilação tirosina da via IRS-1 e IRS-2, desencadeando reações intracelulares aumentando a resistência à insulina. E como existe uma importante correlação entre os componentes do SRA e resistência à insulina

na SOP (AREFI, MOTTAGHI e SHARIFI, 2013) e o bloqueio dos receptores AT1 da Ang II, inativa essa via, diminuindo a resistência à insulina (CARVALHO et al., 2007), podendo, talvez, ter efeitos benéficos também nos aspectos reprodutivos, especialmente no desenvolvimento folicular.

### 5. Modelos experimentais de Obesidade

Vários modelos experimentais têm sido utilizados para estudar a obesidade e a resistência à insulina (CESARETTI e KOHLMANN, 2006):

#### 1) Modelos genéticos:

Devido a alterações monogênicas: por exemplo o camundongo amarelo, onde ocorre mutação no cromossomo 2 que sintetiza o peptídeo relacionado a proteína agouti (AGRP), um potente orexígeno, levando à hiperfagia e obesidade; Outras variedades são: Camundongo ob/ob – ausência de leptina; Rato Zucker (fa/fa); camundongo db/db: resistência hipotalâmica de leptina.

Devido a alterações poligênicas: por exemplo o rato *Otsuka Long-Evans okushima Fatty* (OLETF), com susceptibilidade nos cromossomos 1, 7, 14 e X, leva a hiperfagia por um alelo nulo para a síntese do receptor colecistocinina A, uma substância anorexígena. Outros exemplos: Camundongos KK (diabetes moderado, obesidade e hiperinsulinemia e hiperplasia de células beta-pancreáticas), rato israelense (quando alimentado com ração para roedores desenvolve obesidade, diabetes, dislipidemia, hiperinsulinemia e hiperleptinemia) e rato Goto-Kakizaki (desenvolve hiperglicemia e hiperinsulinemia na idade adulta) - GK.

Transgênicos *Knockout* (desenvolvidos através de técnicas de biologia molecular): por exemplo, *Knockout* para gene da insulina, *Knockout* para gene leptina e seus receptores, *Knockout* para gene da sinalização intracelular de insulina.

#### 2) Modelo de Obesidade produzida pela administração neonatal de monoglutamato de sódio (MSG):

administrado subcutaneamente, na região cervical, por 5 dias, na dose de 4 mg/kg de peso corporal/dia, o MSG causa lesões hipotalâmicas, reduzindo aproximadamente 75% do número de

neurônios do núcleo arqueado e eminência mediana, por meio da necrose e fagocitose circunvizinha, levando à obesidade, porém com normo ou hipofagia (BALBO *et. al*, 2007).

3) Modelos que induzem obesidade pelas mudanças na dieta: é a que mais se assemelha à obesidade humana, por oferecer maior aporte calórico, através de uma sobrecarga de carboidratos ou de gordura, isoladamente ou em associação, e é chamada de dieta ocidentalizada, de *fast-food* ou de cafeteria. É uma dieta de alta palatabilidade que faz com que os roedores substituam a dieta padrão pela dieta de cafeteria. Neste modelo experimental, acrescenta-se ou associa-se à ração padrão substâncias altamente calóricas que variam com os diferentes grupos de pesquisa, como bacon, castanhas, leite condensado, refrigerante, chocolate, amendoim, guloseimas, etc. A dieta de cafeteria produz um incremento de peso corporal de até 3040% ao final de 12 semanas, produzindo aumento significativo na quantidade de gordura visceral. Este modelo é o adotado pelo nosso grupo de pesquisa, já tendo artigos publicados utilizando a dieta de cafeteria contendo 5,42 Kcal/g (AKAMINE *et al.*, 2010, SAGAE *et al.*, 2013).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, K. F.; SCHATZ, K. A.; HARRIS, T. B. Overweight, Obesity, and Mortality in a Large Prospective Cohort of Persons 50 to 71 Years Old. **N Engl J Med**, v. 355, n.8, p.763-778, 2006. Disponível em: <  
<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa055643>
- AKAMINE, E. H. *et. al* Obesity induced by high-fat diet promotes insulin resistance in the ovary. **J Endocrinol**, v.206, n.1, p.65-74, 2010. ISSN 1479-6805 (Electronic) 0022-0795 (Linking).
- ANTUNES-RODRIGUES, J. Neuroendocrinologia básica e Aplicada. **Editora Guanabara Koogan S. A.**, p.318, 2005.
- AREFI, S.; MOTTAGHI, S.; SHARIFI, A. M. Studying the correlation of renin-angiotensin-system (RAS) components and insulin resistance in polycystic ovary syndrome (PCOs). **Gynecol. Endocrinol.**, 2013, v.29, n.5, p.470-473, May 2013. ISSN 0951-3590
- BALBO, S. L. *et. al* Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. **Endocrine**, v.31, n.2, p.142-8, Apr 2007. ISSN 1355-008X.
- BELLVER, J. *et. al* Obesity reduces uterine receptivity: clinical experience from 9,587 first cycles of ovum donation with normal weight donors. **Fertil Steril**, v.100, n.4, p.1050-8, Oct 2013. Doi 10.1016/j.fertnstert.2013.06.001. ISSN 0015-0282.
- BERNARDI, F.; CICHELERO, C.; VITOLO, M. R. Comportamento de restrição alimentar e obesidade. **Revista de Nutrição**, v.18, p.85-93, 2005. ISSN 1415-5273. Disponível em: <  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-52732005000100008&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732005000100008&nrm=iso) >.
- BHATHENA, R. K. Insulin resistance and the long-term consequences of polycystic ovary syndrome. **J Obstet Gynaecol**, v.31, n.2, p.105-10, 2011. ISSN 1364-6893 (Electronic)
- BICKERTON, R. K.; BUCKLEY, J. P. Evidence for a central mechanism of angiotensin induced hypertension. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.106, p.834-836, 1961.
- BOHLER, H. J.; SRIPRAKASH, M.; WINTERS, S. J. Adipose tissue and reproduction in women. **Fertil Steril**, v.94, p.795-825, 2010. ISSN 0015-0282.
- BRANNIAN, J. D. Obesity and fertility. **S D Med**, v.64, n.7, p.251-4, 2011. ISSN 0038-3317 (Print) 0038-3317 (Linking).

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigitel**: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico., Brasília, 2012. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/13145/893/mais-da-metade-da-populacao-brasileira-tem-excesso-de-peso.html> >. Acesso em: 12/10/2013 16:45.

BREWER, C. J.; BALEN, A. H. The adverse effects of obesity on conception and implantation. **Reproduction**, v.140, n.3, p.347-364, September 1, 2010 2010. Disponível em: < <http://www.reproduction-online.org/content/140/3/347.abstract> >. ISSN 14701626

BROEKMANS, F. J. M. *et. al* The antral follicle count: practical recommendations for better standardization. **Fertil Steril**, v.94, n.3, p.1044-1051, 2010. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028209010085> >. ISSN 0015-0282

BUMPUS, F. M. *et. al* Nomenclature for angiotensin receptors. A report of the Nomenclature Committee of the Council for High Blood Pressure Research. **Hypertension**, v.17, n.5, p.720–721, May 1991. ISSN 0194-911X.

C. D. C, CENTER DISEASE CONTROL. **Obesity - Halting the epidemic by making health easier - at a glance 2011**, 2011.

CARVALHO, A. R. O. *et. al* Luta pelo Direito à Saúde no Brasil: analisando a conjuntura 2012. Gasto com saúde no Brasil em 2009. [acesso em 21 dez 2012]. Disponível em: [http://www.sindsepsp.org.br/site/banners/conteudo\\_banners/1\\_analisedeconjunturaGilsondeCarvalho.pdf](http://www.sindsepsp.org.br/site/banners/conteudo_banners/1_analisedeconjunturaGilsondeCarvalho.pdf)>.

CASSIS, L. A. *et. al* Differential effects of local Versus systemic angiotensin II in the regulation of leptin release from adipocytes. **Endocrinology**, v.145, n.1, p.169-174, 2004. ISSN 0013-7227.

CESARETTI, M. L. R.; KOHLMANN, O. J. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.50, n.02, 2006. ISSN 0004-2730.

CHU, K. Y. *et. al* Angiotensin II Type I receptor blockade improves beta-cell function and glucose tolerance in a mouse model of type 2 diabetes. **Diabetes**, v.55, p.367-374, 2006. ISSN 012-1797.

CARVALHO, A. R. O. CARVALHEIRA, J. B. C.; VELLOSO, *et al* Cross-Talk das Vias de Sinalização de Insulina e Angiotensina II: Implicações com a associação entre Diabetes Mellitus e hipertensão arterial e doença cardiovascular. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.51, n.2, p.195-203, 2007. ISSN 0004-2730.

DOKRAS, A. *et. al* Obstetric outcomes after in vitro fertilization in obese and morbidly obese women. **Obstet Gynecol**, v.108, p.61-69, 2006. ISSN 0029-7844

DONADIO, M. V. C. F. *et. al* Angiotensin II receptors in the arcuate nucleus mediate stress-induced reduction of prolactin secretion in steroid-primed ovariectomized and lactating rats. **Brain Res**, v.1006, n.1, p.59-65, 2004. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899304001738> >.

DORNELES, R. C. M.; FRANCI, C. R. Action of AT1 subtype angiotensin II receptors of the medial preoptic area on gonadotropins and prolactin release. **Neuropeptides**, v.32, n.1, p.51-55, 1998. ISSN 0143-4179.

DORRESTEIJN, J. A. N.; VISSEREN, F. L. J.; SPIERING, W. Mechanisms linking obesity to hypertension. **Obes Rev**, v.13, p.17-26, 2012.

DRAKE, A. J.; REYNOLDS, R. M. Impact of maternal obesity on offspring obesity and cardiometabolic disease risk. **Reproduction**, v.140, n.3, p.387-398, September 1, 2010. Disponível em: < <http://www.reproduction-online.org/content/140/3/387.abstract> >. ISSN 1470-1626

DUNAIF, A. Insulin resistance and polycystic ovary syndrome: mechanism and implication for pathogenesis. **Endocr Rev**, v.18, p.774-800, 1997. ISSN 0163-769X.

DUNCIA, J. V. *et. al* The discovery of potent nonpeptide angiotensin II receptor antagonists: A new class of potent antihypertensives. **J Med Chem**, v.33, p.1312-1329, 1990. ISSN 0022-2623.

FELLIPPE, F.; SANTOS, A. M. Novas demandas profissionais: obesidade em foco. **Revista da Associação de Docentes e Pesquisadores da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (ADPUCRS)**, Porto Alegre, v.5, p.63-70, dez. 2004.

FITZSIMON, J. T. Angiotensin Stimulation of the Central Nervous System. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v.87, p.117-161, 1980. ISSN 0303-4240.

FREEMAN, M. E. The ovarian cycle of the rat. **Physiology of Reproduction**, Raven Press, New York, v.45, p.613-657, 1994.

FYHRQUIST, F.; SAIJONMAA, O. Renin-angiotensin system revisited. **J Intern Med**, v.264, n.3, p.224-36, 2008. ISSN 1365-2796 (Electronic)

GAMBINERI, A. *et. al* Obesity and polycystic ovary syndrome. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v.26, p.883-896, 2002.



- GARCIA, R. W. D. Reflexos da globalização na cultura alimentar: considerações sobre as mudanças na alimentação urbana. **Revista de Nutrição (online)**, v.16, n.04, p.483-492, out/dez., 2003.
- GOLDMAN, Lucien. Dialética e cultura. Rio de Janeiro: Paz e Terra, 1979.
- GOOSSENS, G. H.; MCQUAID, S.E.; DENNIS, A. L. Angiotensin II: a major regulator of subcutaneous adipose tissue blood flow in humans. **J Physiol**, v.571,p.451-460, 2006.
- GOSMAN, G. G.; HEATHER, I. K.; LEGRO, R. S. Obesity and the role of gut and adipose hormones in female reproduction. **Hum Reprod Update**, v.12, n.5, p.585-601, 2006. ISSN 1355-4786.
- GREENWALD, G.; ROY, S. Follicular development and its control. **Physiology of Reproduction (E. Knobil and J. Neill, Eds)**, p.629-724, 1994.
- HAJER, G. R.; VAN HAEFTEN, T. W.; VISSEREN, F. L. J. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. **Eur Heart J**, v.29, n.24, p.2959-2971, December 1, 2008 Disponível em: <  
<http://eurheartj.oxfordjournals.org/content/29/24/2959.abstract> >. ISSN 0195-668X
- HAJER, G. R. *et. al*/ Low plasma levels of adiponectin are associated with low risk for future cardiovascular events in patients with clinical evident vascular disease. **Am Heart J**, v.154, p.750. e 1-7, 2007. ISSN 0002-8703.
- HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. **Int Rev Cytol**, v.124, p.43-101, 1991. ISSN 0074-7696.
- HOENACK, C.; ROESEN, P. Inhibition of angiotensin type 1 receptor prevents decline of glucose transporter (GLUT 4) in diabetic rat heart. **Diabetes**, v.45, n.Suppl 1, p.82-87, 1996. ISSN 0012-1797.
- HOWEL, D. Trends in the prevalence of obesity and overweight in English adults by age and birth cohort, 1991-2006. **Public Health Nutr**, v. 14, n.01, p.27-33, 2011. ISSN 1368-9800. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1017/S136898001000056X> >. Acesso em: 2011.
- HOWLES, C. M. Genetic engineering of human FSH. **Human Reprod Update**, v.2, p.172-91, 1996. ISSN 1355-4786
- INAGAMI, T. Angiotensin Receptors. In: EDITORS-IN-CHIEF: WILLIAM, J. L. e LANE, M. D. (Ed.). **Encyclopedia of Biological Chemistry**. New York: Elsevier, p111-115, 2004. ISBN 978-0-12-443710-4.
- INAGAMI, T. *et. al*/ The renin-angiotensin system: an overview of its intracellular function. **Cardiovasc Drugs Ther**, v.2, p.453-458, 1988. ISSN 0920-3206.

ISRAEL, A.; PLUNKETT, L. M.; SAAVEDRA, J. M. Quantitative autoradiographic characterization of receptors for angiotensin II and other neuropeptides in individual brain nuclei and peripheral tissues from single rats. **Cell Mol Neurobiol**, v.5, p.211-222, 1985. ISSN 0272-4340.

JAPIASSU, H. A interdisciplinaridade e a patologia do saber. **Imago**, p.38-69, 1976.

KEYS, A. *et. al* Indices of relative weight and obesity. **J Chronic Dis**, v.25, n.6-7, p.329-343, 1972. ISSN 0021-9681. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0021968172900276> >.

KONING, A. M. H *et. al* Economic consequences of overweight and obesity in infertility: a framework for evaluating the costs and outcomes of fertility care. **Human Reprod Update**, v.16, n.03, p.246-254, 2010. ISSN 1355-4786.

KUCHENBECKER, W. K. H. *et. al* The Subcutaneous Abdominal Fat and Not the Intraabdominal Fat Compartment Is Associated with Anovulation in Women with Obesity and Infertility. **J Clin Endocrinol Metab**, v.95, n.5, p.2107-2112, May 1, 2010. Disponível em: <  
<http://jcem.endojournals.org/content/95/5/2107.abstract> >. ISSN 0021-972X.

LARA, H. E. *et. al* An increased intraovarian synthesis of growth factor and its affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. **Endocrinology**, v.141, n.3, p.1059-1072, 2000. ISSN 0013-7227.

LIGHTMAN, A. *et. al* 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.808-816, 1987. ISSN 0002-9378.

LIMM, S. S. *et. al* Overweight, obesity and central obesity in women with polycystic ovary syndrome: a sistematic review and meta-analysis. **Human Reprod Update**, v.0, n.0, p.1-20, 2012. ISSN 1355-4786.

LOUIS, S.; SAWARD, L.; ZAHRADKA, P. Both AT1 and AT2 receptors mediate proliferation and migration of porcine vascular smooth muscle cells. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.301, n.3, p.H746-56, Sep 2011 ISSN 0363-6135.

LOPEZ, E. A. D. *et. al* Comparative quantification of Health Risks: Global and regional Burden of disease attributable to selected major risk factors. **Geneva: WHO**, p.497-596, 2004.

LUTHER, J. M.; BROWN, N. J. The renin-angiotensin-aldosterone system and glucose homeostasis. **Trends Pharmacol Sci**, v.32, n.12, p.734-9, 2011. ISSN 1873-3735 (Electronic) 0165-6147 (Linking).

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz J Biol**, v.62, p.609-614, 2002. ISSN 1519-6984.

MCGUIRE, D. K. *et. al* Blocking the renin-angiotensin-aldosterone system to prevent diabetes mellitus. **Diab Vasc Dis Res**, v.5, n.1, p.59-66, 2008. ISSN 1479-1641 (Print) 1479-1641 (Linking).

MILLER, J.; ROSENBLOOM, A.; SILVERSTEIN, J. Childhood Obesity. **J Clin Endocrinol Metab**, v.89, n.9, p.4211-4218, September 1, 2004 2004. Disponível em: < <http://jcem.endojournals.org/content/89/9/4211.short> >. ISSN 0021-972X.

MINDNICH, R.; MÖLLER, G.; ADAMSKI, J. The role of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases. **Molecular Cell Endocrinol.**, v.218; p.7-20, 2004.

MORAGIANNI, V. A.; JONES, S. M.; RYLEY, D. A. The effect of body mass index on the outcomes of first assisted reproductive technology cycles. **Fertil Steril**, v.98, n.1, p.102-8, 2012. ISSN 1556-5653 (Electronic) 0015-0282 (Linking).

MORAN, L. J. *et. al* Obesity and reproductive dysfunction in women. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v.40, n.4, p.895-906, 2011. ISSN 1558-4410 (Electronic) 0889-8529 (Linking).

MORGAN, L.; PIPKIN, F. B.; KALSHEKER, N. Angiotensinogen: molecular biology, biochemistry and physiology. **Int J Biochem Cell Biol**, v.28, n.11, 1996. ISSN 1357-2725.

MOTTA, A. B. The role of obesity in the development of polycystic ovary syndrome. **Curr Pharm Des**, v.18, n.17, p.2482-91, 2012. ISSN 1873-4286 (Electronic)

NORMAN, J. E. The adverse effects of obesity on reproduction. **Reproduction**, v.140, n.3, p.343-345, September 1, 2010 Disponível em: < <http://www.reproduction-online.org/content/140/3/343.short> >. ISSN 1470-1626.

NORMAN, J. E. *et. al*. Polycystic ovary syndrome. **Lancet**, v.370, p.685-697, 2007. ISSN 0140-6736.

NORMAN, R. J. *et. al* Improving reproductive performance in overweight/obese women with effective weight management. **Human Reprod Update**, v.10, n.3, p.267-280, May 1, 2004 Disponível em: < <http://humupd.oxfordjournals.org/content/10/3/267.abstract> >. ISSN 1355-4786

OGDEN, C. L. *et al* The Epidemiology of Obesity. **Gastroenterology**, v.132, n.6, p.2087-2102, 2007. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508507005793> >.

OGDEN, C. *et al* Prevalence of obesity and trends in body mass index among US children and adolescents, 1999-2010. **JAMA**, v.307, n.5, p.483-490, 01 Feb 2012. ISSN 0098-7484.

OKTEM, O.; OKTAY, K. The ovary: anatomy and Function Throughout Human Life. **Ann N Y Acad Sci**, v.1127, p.1-9, 2008. ISSN 0077-8923.

OLIVEIRA-JUNIOR, S. A. *et al* AT1 receptor blockade attenuates insulin resistance and myocardial remodeling in rats with diet-induced obesity. **PLoS One**, v.9. n.1, p.e86447, Jan 23, 2014. ISSN 1932-6203.

PAGE, I. H. Hypertension mechanisms. **Grune & Stratton, Inc., New York**, 1987.

PASQUALI, R.; GAMBIERI, A. Metabolic effects of obesity on reproduction. **Reprod Biomed Online**, v.12, p.524-551, 2006. ISSN 1472-6483.

PASQUALI, R.; PATTON, L.; GAMBIERI, A. Obesity and Infertility. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v.14, p.482-487, 2007. ISSN 1752-296X.

PASQUALI, R. *et al* Obesity and reproductive disorders in women. **Human Reprod Update**, v.9, n.4, p.359-372, July 1, 2003. Disponível em: < <http://humupd.oxfordjournals.org/content/9/4/359.abstract> >. ISSN 1355-4786

PAULI, J. M. *et al* Current perspectives of insulin resistance and polycystic ovary syndrome. **Diabet Med**, v.28, n.12, p.1445-54, 2011. ISSN 1464-5491 (Electronic) 0742-3071 (Linking).

PENZIAS, A. S. Recurrent IV failure: others factors. **Fertil Steril**, v.97, n.5, p.1033-1038, 2012. ISSN 1556-5653 (Electronic) 0015-0282 (Linking).

PEREIRA, L. O.; FRANCISCHI, R. P. D.; LANCHETA, A. H. J. Obesidade: Hábitos nutricionais, Sedentarismo e Resistência à insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.47, n.02, p.111-127, 2003. ISSN 0004-2730.

PHILLIPS, C. M. *et al* Obesity and body fat classification in the metabolic syndrome: impact on cardiometabolic risk metabolotype. **Obesity (Silver Spring)**, v.28, n.Jun, 2012. ISSN 1930-7381.

PHILLIPS, M. I. Functions of angiotensin in the central nervous system. **Annu Rev Physiol**, v.49, p.413-435, 1987. ISSN 0066-4278.

PINTEROVA, L.; KRIZANOVA, O.; ZORAD, S. Rat Epididymal fat tissue express all components of the renin-angiotensin system. **Gen Physiol Biophys**, v.19, n.3, p.329-334, 2001. ISSN 0231-5882.

ROBKER, R. L. Evidence that obesity alters the quality of oocytes and embryos. **Pathophysiology**, v.15, p.115-121, 2008. ISSN 0928-4680.

Rotterdam ESHRE-ASRM Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). **Hum Reprod** v.19,p.41-47, 2004 ISSN 0268-1161.

SAAVEDRA, J. M. Brain and pituitary angiotensin. **Endocr Rev**, v.13, p.329-380, 1992. ISSN 0163-769X.

SAGAE, S. C. *et. al* Prevention of metabolic disorders and reproductive performance deficits by the blockade of Angiotensin II AT1 receptor in female rats fed with cafeteria diet. **Physiol Behav**, 2013. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.05.029>. ISSN 0031-9384.

SAGAE, S. C. *et. al* Early onset of obesity induces reproductive deficits in female rats. **Physiol Behav**, v.105, n.5, p.1104-1111, 2012. ISSN 0031-9384. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031938411005579> >. ISSN 0031-9384..

SANTORO, N. *et. al* Body size and ethnicity are associated with menstrual cycle alterations in women in the early menopausal transition: The study of Women's Health across Nation (SWAN) Daily Hormone Study. **J Clin Endocrinol Metab**, v.89, p.2622-2631, 2004. ISSN 0021-972X.

SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R.; R., VAN DER HURK R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. **Theriogenology**, v.71, p.1193-1208, 2009. ISSN 0093-691X.

SMITH, P. E. Hypophysectomy and replacement therapy in the rat. **Am J Anat**, v.45, p.205-74, 1930

SMITH, S. S. Progesterone enhances inhibitory responses of cerebellar Purnkinje cells mediated by GABA-A receptor subtype. **Brain Res Bull**, v.23, p.317-322, 1999. ISSN 0361-9230.

SPEROFF, L.; FRITZ, M. A. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. Seventh Edition, cap.3-6, 2005

SPIEGELMAN, B. M.; FLIER, J. S. Obesity and The Regulation of Energy Balance. **Cell**, v.104, p.531-543, February 3 2001. ISSN 0092-8674.

STEELE, M. K. Effects of angiotensin injected into various brain areas on luteinizing hormone release in female rats. **Neuroendocrinology**, v.46, n.5, p.401-405, 1987. ISSN 0028-3835.

STEELE, M. K.; GALLO, R. V.; GANONG, W. F. A possible role for brain renin-angiotensin system in the regulation of LH secretion. **Am J Physiol**, v.245, n.6, p.R 805-810, 1983. ISSN 0002-9513.

STEELE, M. K.; GALLO, R. V.; GANONG, W. F. Stimulatory or inhibitory effects of angiotensin II upon LH secretion in ovariectomized rats: a function of gonadal steroids. **Neuroendocrinology**, v.40, n.3, p.210-216, 1985. ISSN 0028-3835

STEELE, M. K.; MCCANN, S. M.; NEGRO-VILAR, A. F. Modulation by dopamine and estradiol of the central effects of angiotensin II on anterior pituitary hormone release. **Endocrinology**, v.111, p.711-729, 1982. ISSN 0013-7227.

STEPHENSON, J. Obesity and Fertility. **JAMA**, v.299, n.03, p.279, January 23 2008. ISSN 0098-7484.

STRAZZULLO, P.; GALLETTI, F. Impact of the renin-angiotensin system on lipid and carbohydrate metabolism. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v.13, p.325-332, 2004. ISSN 1062-4821.

SZAWKA, R. E.; ANSELMO FRANCI, J. A. A secondary surge of prolactin on the estrus afternoon. **Life Sci**, v.75, p.911-922, 2004. ISSN 0024-3205.

TAKAHASHI, N. L. I. *et. al* Increased energy expenditure, dietary fat wasting and resistance to diet-induced obesity in mice lacking renin. **Cell Metab**, v.6, n.6, p.506-512, 2007. ISSN 1550-4131.

TAVARES, T.; NUNES, S. M.; SANTOS, M. O. Obesidade e qualidade de vida: Revisão da literatura. **Rev Med Minas Gerais**, v.20, n.03, p.359-366, 2010.

TAYLOR, A. E. *et. al* Determinants of abnormal gonadotropin secretion in clinically defined women with polycystic ovary syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, v.82, n.07, p.2248-2256, 1997. ISSN 0021-972X.

THATCHERS, S. *et. al* The adipose renin-angiotensin system: role in cardiovascular disease. **Mol Cell Endocrinol**, v.302, p.111-117, 2009. ISSN 0303-7207.

THAYHURN, P.; BING, C.; WOOD, I. S. Adipose tissue and adipocytokines. **J Nutr**, v.136, (7suppl),p.1935S-1939S, 2006.

THIESEN, J. D. S. A interdisciplinaridade como um movimento articulador no processo ensino-aprendizagem. **Revista Brasileira de Educação**, v.13, n.39, p.545-554, set/dez 2008.

VAN HOUNTEN M. *et. al*/ Radioautographic localizations of specific binding sites for blood-borne angiotensin II in rat brain. **Brain Res**, v.186, p.480, 1980. ISSN 0006-8993.

VERASZTO, E. V. *et. al*/ Desafios da globalização para garantir um desenvolvimento científico tecnológico e sustentável. **Revista do Centro de Educação à Distância - CEAD/UDESC**, v.2, p.15-36, 2009. ISSN 1984-206.

W. H. O., World Health Organization. **Obesity: preventing and managing the global epidemic**. SERIES, T. R. Geneva: World Health Organization 2000.

WANG, Y. Is obesity associated with early sexual maturation? A comparison of the association in American boys versus girls. **Pediatrics**, v.110, p.903-910, 2002. ISSN 0031-4005.

WHITEBREAD, S. *et. al*/ Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. **Biochem Biophys Res Commun**, v.163, p.284-91, 1989. ISSN 0006-291X.

WITHROW, D.; ALTER, D. A. The economic burden of obesity worldwide: a systematic review of the direct costs of obesity. **Obes Rev**, v.12: p.131–41, 2011. ISSN 1467-7881.

WITTEMER, C. *et. al*/ Does body mass index of infertile women have an impact on IVF procedure and outcome? **J Assist Reprod Genet**, v.17, p.547-552, 2000. ISSN 1058-0468.

WONG, P. C. *et. al*/ Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. IX. Antihypertensive activity in rats of DuP 753, an orally active antihypertensive agent. **J Pharmacol Exp Ther**, v.252, p.726-732, 1990. ISSN 0022-3565.

WU, S. *et. al*/ Reproductive tissues maintain insulin sensitivity in diet-induced obesity. **Diabetes**, v.61, n.1, p.114-23, 2012. ISSN 1939-327X (Electronic) 0012-1797 (Linking).

WU, S. *et al* Obesity-induced infertility and hyperandrogenism are corrected by deletion of the insulin receptor in the ovarian theca cell. **Diabetes**, v.63, n.4, p.1270-82, Apr 2014. Doi:10.2337/db13-1514. ISSN 1939-327X (Electronic) 0012-1797 (Linking)

YOSHIMURA, Y. The ovarian Renin-Angiotensin System in Reproductive Physiology. **Front Neuroendocrinol**, v.18, p.247-291, 1997. ISSN 0091-3022.

ZORAD, S. *et. al*/ Long-term angiotensin II AT 1 receptor inhibition produces adipose tissue hypotrophy accompanied by increased expression of adiponectina and PPARgamma. **Eur J Pharmacol**, v.552, n.1-3, p.112-122, 2006. ISSN 0014-299

## ARTIGO CIENTÍFICO

O BLOQUEIO DO RECEPTOR AT1 DA ANGIOTENSINA II REDUZ O  
NÚMERO DE FOLÍCULOS ANTRAIIS EM RATAS COM OBESIDADE  
INDUZIDA PELA DIETA DE CAFETERIA



O BLOQUEIO DO RECEPTOR AT<sub>1</sub> DA ANGIOTENSINA II REDUZ O NÚMERO DE FOLÍCULOS ANTRAIS EM RATAS COM OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA DE CAFETERIA

Sara Cristina Sagae<sup>1</sup>; Cristiane Gisselda Gobo<sup>1,2</sup>; Edson Duarte Ribeiro Paz<sup>1</sup>; Juliana Beal Menegotto<sup>1</sup>; Patrícia Kanae Yamashita<sup>1</sup>; Marina Gabriela Birck<sup>1</sup>; Celso Rodrigues Franci<sup>3</sup>; Sandra Lucinei Balbo<sup>1</sup>

**1** Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo (LAFEM), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, PR, Brasil.

**2** Ginecologia e Obstetrícia, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, PR, Brasil.

**3** Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

Trabalho desenvolvido na UNIOESTE – UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ

Rua Universitária, 1619

85819-110

Cascavel – Paraná

**\*Correspondência para** Sandra Lucinei Balbo

Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo

Cascavel, PR, Brasil CEP: 858119-110

E-mail: slbalbo@hotmail.com

Fone/Fax: +55 45 3220 3257

Não há conflito de interesse dos autores

E-mail dos autores:

sara.sagae@unioeste.br

cristianeggobo@hotmail.com

souabriguero@hotmail.com

juliana@beal.com.br

yamashita.kanae@hotmail.com

marina-birck@hotmail.com

crfranci@fmrp.usp.br

slbalbo@hotmail.com

## Resumo

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar o desenvolvimento folicular de ratas *Wistar* adultas, com obesidade induzida por dieta de cafeteria, submetidas à administração de Losartan, um antagonista do receptor  $AT_1$  da Ang II. Métodos: A partir do desmame (21 dias de idade) até a idade adulta e eutanásia (100 dias de idade), as ratas foram separadas em 02 grupos: controle (CTL) que recebeu ração padrão e Cafeteria (CAF) que recebeu a dieta de cafeteria. A partir dos 70 dias de vida iniciou-se a administração de Losartan ou água por gavagem. O grupo CTL recebeu água e o grupo CAF foi separado em 02 subgrupos, CAF, que recebeu água e CAF+LOS, que recebeu Losartan. Foram utilizados 15 animais por grupo. A eutanásia foi realizada no primeiro proestro após 30 dias da administração de Losartan ou de água. As gorduras retroperitoneal, perigonadal e subcutânea foram retiradas e pesadas. Foi realizada a contagem do número de folículos primários, secundários, antrais e maduros por ovário. Também foram coletadas amostras de sangue para dosagens de FSH, LH, prolactina e progesterona. Resultados: O peso corporal, bem como, o peso das 03 gorduras avaliadas, e, o número de folículos antrais foi estatisticamente maior no grupo CAF em relação ao CTL ( $P < 0,001$ ). Todavia, as concentrações de FSH e LH foram menores nos animais CAF em relação ao grupo CTL ( $P < 0,001$ ). A administração do Losartan normalizou o peso corporal e o acúmulo das gorduras retroperitoneal e subcutânea, bem como, o número de folículos antrais. Conclusão: Sugerimos que o uso do antagonista do receptor  $AT_1$  da Ang II, o Losartan, na vida adulta, pode contribuir para melhorar o desenvolvimento folicular em fêmeas com obesidade induzida por dieta de cafeteria e futuramente ser utilizado como fármaco coadjuvante no tratamento da infertilidade associada à obesidade.

Palavras-Chave: obesidade, infertilidade, Losartan, desenvolvimento folicular.

## Abstract

**Objective:** The aim of this study was to evaluate the follicular development of adult female Wistar rats, with obesity induced by cafeteria diet and with Losartan administration, an antagonist of the AT<sub>1</sub> receptor of Ang II. **Methods:** From weaning (21 days of age) till adulthood and euthanasia (100 days of age), female rats were divided in 2 groups: Control (CTL) that received standard chow and Cafeteria (CAF) that received cafeteria diet. From 70 days of age, Losartan or water were administrated by gavage. The CTL group received water and the cafeteria group were divided in 2 groups: CAF that received water and CAF + LOS that received Losartan. Each group consisted in 15 animals. Euthanasia was performed on the first proestrus after 30 days of Losartan or water administration. The retroperitoneal fat as well the perigonadal and the subcutaneous fats were isolated and weighed. The number of primary, secondary, antral and mature follicles per ovary was counted. Blood samples were also collected for determination of FSH, LH, prolactin and progesterone levels. **Results:** The body weight as well as the weight of the 03 fats measured, and the number of antral follicles were higher in CAF group compared to CTL group ( $P < 0.001$ ). However, FSH and LH levels were lower in CAF animals compared to CTL animals ( $P < 0.001$ ). Losartan administration normalized the body weight and the retroperitoneal and subcutaneous pads as well as the number of antral follicles. **Conclusion:** We suggest that the use of Losartan in adulthood may improve follicular development in female with obesity induced by cafeteria diet intake and, hereafter, it could be an adjunctive drug in the treatment of infertility associated with obesity. **Key Words:** obesity, infertility, Losartan, follicular development

O bloqueio do receptor AT<sub>1</sub> da Angiotensina II reduz o número de folículos antrais em ratas com obesidade induzida por dieta de cafeteria

Blockade of AT<sub>1</sub> receptor of Angiotensin II reduces the number of antral follicles in female rats with obesity induced by cafeteria diet

## Introdução

A obesidade tornou-se uma epidemia mundial e atualmente é um dos maiores problemas de saúde pública. Tem se observado também o aumento do índice da obesidade na infância e na adolescência e, muitas patologias associadas com esta doença, adquiridas nessa fase, podem se estender até a vida adulta (1).

A obesidade tem efeitos deletérios nas funções metabólica e cardiovascular e muitos estudos mostram que há uma relação entre a obesidade e as alterações nos aspectos reprodutivos, tanto em fêmeas de roedores (2), quanto em mulheres (3). Fêmeas de roedores com obesidade induzida por dieta de cafeteria, que consiste em uma dieta altamente calórica e palatável, apresentam ausência dos picos pré-ovulatórios de LH e progesterona, com conseqüente redução na ovulação (4). Porém, os mecanismos envolvidos nessas alterações ainda não estão bem estabelecidos.

A concentração plasmática de Ang II, um hormônio peptídico conhecido por atuar no controle do balanço do fluido vascular e na função cardiovascular (5), está aumentada na obesidade e pode ter um papel mediador nas alterações reprodutivas relacionadas com esta doença (4). O bloqueio do receptor AT<sub>1</sub> da Ang II desde o desmame em fêmeas de roedores, previne a hipertrofia do tecido adiposo, melhora a sensibilidade à insulina, restabelece o pico pré-ovulatório de LH e a ovulação, além de melhorar o perfil reprodutivo em fêmeas de roedores (6).

Na década de 80, Steel e colaboradores demonstraram que o aumento na concentração de Ang II no hipotálamo, no período pré-ovulatório, é importante para a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (7). A injeção intracerebroventricular de Ang II estimula a secreção pré-ovulatória de LH (8), a qual potencializa a atividade da renina intrafolicular e aumenta a concentração de Ang II no folículo (9). A Ang II produzida nos ovários parece estimular a maturação oocitária e a ovulação (10).

Diante do exposto, sugere-se que a Ang II possa agir como um mediador nas disfunções reprodutivas associadas com a obesidade. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do Losartan (antagonista do receptor  $AT_1$  da Ang II), administrado na vida adulta, sobre o desenvolvimento folicular ovariano de ratas com obesidade induzida por dieta de cafeteria.

## Metodologia

Ratas *Wistar* prenhas, provenientes do biotério central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) foram mantidas no biotério setorial do laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo, em caixas individuais, em ambiente com ciclo claro-escuro de 12 horas, com temperatura controlada ( $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), com livre acesso a água e ração. Após o nascimento, no máximo 08 filhotes fêmeas, foram mantidos com suas respectivas mães. Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIOESTE (certificado número 0021/2013 – CE; anexo I). Foram seguidas as normas contidas no CIOMS (Council for International Organization of Medical Sciences) Ethical Code for Animal Experimentation (11) e os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.

Após o desmame, aos 21 dias de vida, as ratas foram separadas em 02 grupos: 1) controle (CTL) que recebeu dieta padrão (12.39 kJ/g: 60% de carboidratos, 22% de proteínas e 10% de gordura — Nutrilab™, Colombo, Brazil) e 2) Cafeteria (CAF) que recebeu a dieta de cafeteria (22.76 kJ/g: 49% de carboidratos, 22% de proteínas e 24% de gordura) (6). A partir dos 70 dias de vida iniciou-se a administração de Losartan ou água, por gavagem. O grupo CTL recebeu água e o grupo CAF foi separado em 02 subgrupos: CAF, que recebeu água, e CAF+LOS, que recebeu 30 mg/Kg de peso corporal/dia de Losartan, até a eutanásia com 100 dias de vida (12), totalizando 03 grupos com 15 animais cada.

A partir do 70º dia de vida, foi coletado diariamente, a partir das 9 horas da manhã, o esfregaço vaginal de todas as fêmeas, os quais foram analisados a fresco ao microscópio óptico para determinação da fase do ciclo estral (13).



A eutanásia (100 dias de idade) foi realizada no primeiro proestro, após 30 dias do início da administração de Losartan ou de água e consistiu de decapitação em guilhotina. Os animais foram pesados e as gorduras perigonadal, retroperitoneal e subcutânea foram isoladas e pesadas para avaliação da obesidade.

Os ovários direito de cada fêmea foram retirados, isolados e fixados em paraformaldeído a 10%, e posteriormente foram incluídos em parafina para processamento histológico. Foram realizados cortes seriados de 8  $\mu$ m de espessura em todo o ovário e corados com hematoxilina e eosina. Utilizando-se microscópio óptico, associado a um sistema de imagens (Pro-Image plus), todos os cortes foram analisados de acordo com os critérios adotados por Lara e colaboradores (2000) (14), com modificações. Foram contados o número de folículos primários, secundários, antrais e maduros por ovário, no corte onde o oócito era mais evidenciado. Contou-se também o número de cistos e folículos atrésicos por ovário. Realizou-se a medida do diâmetro dos folículos maduros em seu maior eixo, e a medida da espessura da camada da teca interna e externa desses folículos maduros.

No dia da eutanásia, o sangue foi coletado em tubos e funis previamente heparinizados, o plasma foi separado e congelado à  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior dosagem dos hormônios FSH, LH, progesterona e prolactina por radioimunoensaio. As concentrações plasmáticas de todos os hormônios foram determinadas utilizando-se kits específicos para cada hormônio.

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e foram analisados pelo teste de variância ANOVA de 01 via, seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. Como critério de significância foi adotado  $P < 0,05$ .

O desfecho primário no cálculo da amostra para os experimentos propostos, com nível de significância  $P < 0,05$  e poder de 80%, baseou-se em estudo prévio realizado

em nosso laboratório (4). Os cálculos foram realizados utilizando-se o programa PEPI 4.0 e o Prisma.

## Resultados

Observa-se na tabela I que a dieta de cafeteria induziu a obesidade nos animais. O peso corporal e o peso das gorduras perigonadal, retroperitoneal e subcutânea foram 20%, 71%, 86% e 57%, respectivamente, maiores no grupo CAF quando comparado com o grupo CTL (Tabela I). O tratamento com Losartan não influenciou o peso da gordura perigonadal. Este parâmetro foi similar entre os grupos CAF e CAF+LOS. Todavia, o peso corporal e das gorduras retroperitoneal e subcutânea foram 16%, 19% e 45% menores, respectivamente, no grupo CAF+LOS em relação ao grupo CAF (Tabela I), demonstrando que o tratamento com Losartan preveniu o acúmulo de gordura nos animais tratados com a dieta de cafeteria.

O número de folículos primários (Figura IA), secundários (Figura IB) e maduros (Figura ID), por ovário, foi semelhante entre os grupos CTL e CAF, demonstrando que a dieta de cafeteria não influenciou estes parâmetros. O tratamento com Losartan não influenciou o número de folículos primários (Figura IA) e maduros (Figura ID), entretanto, reduziu 49% o número de folículos secundários no grupo CAF+LOS em relação ao grupo CAF (Figura IB). Na figura IC observa-se que o número de folículos antrais foi 76% maior no grupo CAF em relação ao grupo CTL e foi semelhante entre os grupos CTL e CAF+LOS, demonstrando que o Losartan bloqueou o aumento do número de folículos antrais induzido pela ingestão da dieta de cafeteria.

Conforme as figuras IIA e IIB, o diâmetro dos folículos maduros e a espessura das camadas da teca, respectivamente, foram semelhantes entre os grupos CTL e CAF. O tratamento com Losartan não influenciou estes parâmetros, visto que em ambos, o grupo CAF+LOS foi estatisticamente similar ao grupo CAF.

Observa-se nas figuras IIIA e IIIB que as concentrações plasmáticas de FSH e LH foram 38% e 30%, respectivamente, menores no grupo CAF quando comparado com o grupo CTL. Entretanto, as concentrações destes dois hormônios nos animais CAF+LOS foram semelhantes quando comparadas ao grupo CTL ou ao grupo CAF. Isto demonstra que o tratamento com o Losartan melhorou parcialmente estes parâmetros, evitando a redução das concentrações de FSH e de LH induzida pela dieta de cafeteria, porém sem alcançar os valores do grupo CTL. Nas figuras IIIC e IIID, observa-se que as concentrações de progesterona e prolactina, respectivamente, foram semelhantes entre os grupos CTL, CAF e CAF+LOS, demonstrando que a dieta de cafeteria, isolada ou associada ao Losartan, não influenciou estes parâmetros.

## Discussão

No presente estudo, a administração do bloqueador do receptor AT<sub>1</sub> da Ang II reduziu o peso das gorduras retroperitoneal e subcutânea em ratas com obesidade induzida por dieta de cafeteria. Prévios estudos mostram claramente que em humanos e animais, o tratamento com antagonistas do receptor AT<sub>1</sub> da Ang II é benéfico contra a obesidade, resistência à insulina e hipertensão (3, 14). Em contraste, no presente estudo, o Losartan não alterou o peso da gordura perigonadal das fêmeas obesas, postulando efeitos tecido-específico desta droga.

Adicionalmente, várias evidências mostram que o SRA está envolvido no controle da fertilidade. No ovário humano, todos os componentes do SRA foram evidenciados por meio de análise proteica, enquanto que no ovário de ratas apenas compostos isolados do SRA são expressos (10). Receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> foram detectados em células da granulosa de folículos primordial, primário, e folículos secundários (17). Em células da granulosa-luteínica humana coletadas durante a fertilização in vitro (FIV), também são expressos vários componentes do SRA. A Angiotensina II e seus receptores AT<sub>1</sub> / AT<sub>2</sub> parecem exercer efeitos reguladores no ovário em relação à maturação do núcleo do oócito e ovulação em mulheres (10), e a regulação dos processos angiogênicos é necessária para assegurar o constante crescimento, maturação e morte do corpo lúteo (18).

Sugerindo que o SRA está envolvido nos problemas de fertilidade associados à obesidade, recentemente, mostramos o efeito preventivo do Losartan, administrado desde o desmame e concomitante à oferta da dieta de cafeteria, sobre o bloqueio do pico pré-ovulatório de progesterona e LH e sobre a consequente redução ovulatória induzida pela obesidade em ratas (6). Diferindo deste trabalho, no presente estudo, iniciamos a administração de Losartan na vida adulta, 50 dias após o início da oferta

da dieta de cafeteria, com o objetivo de avaliar um possível papel reversor, ao invés de preventivo, do Losartan sobre o desenvolvimento folicular de ratas obesas.

As fêmeas alimentadas com a dieta de cafeteria apresentaram aumento no número de folículos antrais comparado ao grupo controle em nosso estudo. Essa característica é similar à observada na Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP), a mais comum desordem endócrina da mulher em idade reprodutiva (19) e caracterizada por anovulação crônica, hiperandrogenismo e resistência à insulina. Essas alterações são frequentemente agravadas pela obesidade e estão associadas à presença de múltiplos folículos antrais não atrésicos de médio tamanho nos ovários (20). A SOP é experimentalmente induzida em modelos animais pela administração de valerato de estradiol (21). Estes animais apresentam muitos folículos antrais nos ovários ao invés de folículos pré-ovulatórios dominantes (14). Nós evidenciamos o aumento no número de folículos antrais nas fêmeas alimentadas com a dieta de cafeteria, o que corrobora com o observado pela indução de SOP. Todavia, assim como a espessura da camada da teca e o diâmetro dos folículos maduros, em resultados não apresentados, o número de folículos atrésicos e de cistos ovarianos foi semelhante, respectivamente, entre as fêmeas obesas ( $2,6 \pm 1,4$  e  $0,8 \pm 0,6$ ) e o grupo controle ( $4,6 \pm 0,7$  e  $1,0 \pm 0,5$ ), diferindo morfológicamente dos modelos experimentais de SOP que exibem uma grande quantidade de cistos ovarianos e hipertrofia tecal (21). Isso pode ser atribuído a diferenças nos modelos experimentais, visto que os modelos de SOP induzidos pelo valerato de estradiol, não apresentam obesidade e incluem uma sobrecarga exógena de estradiol.

No presente estudo, a espessura da camada da teca e o diâmetro dos folículos maduros não foram alterados pela administração de Losartan, bem como o número de folículos atrésicos ( $4,6 \pm 1,1$ ) e de cistos ovarianos ( $0,6 \pm 0,4$ ). Todavia, normalizou o

número de folículos secundários e antrais em fêmeas obesas, o que complementa e fortalece as evidências da relação entre SRA e as alterações na fertilidade associadas à obesidade (6) e, as evidências de uma atividade maior do SRA na SOP, sugerem uma correlação importante entre o SRA e SOP (23).

Considerando que em nossos resultados as ratas obesas apresentaram redução nas concentrações plasmáticas de FSH e de LH, sugerimos que estas alterações contribuíram para o aumento no número de folículos antrais das mesmas. Carriere e colaboradores, 1991 (24), propuseram que a SOP poderia ser primariamente, uma resposta à ausência prolongada de picos de gonadotrofinas. Desta forma, considerando esta hipótese, alterações no pico pré-ovulatório de FSH e de LH poderiam contribuir para estas alterações. De fato, o FSH é necessário para a formação do antro e também em fases posteriores do desenvolvimento folicular, assim como, para a transição de folículos com pequeno antro a folículos maiores (25). Adicionalmente, a supressão do gene do receptor de LH promove redução no desenvolvimento folicular, que raramente prossegue para além do estágio antral precoce e não pode ser induzido por meio de tratamento com gonadotrofina exógena (26).

Em nosso estudo, as concentrações de LH e FSH foram reduzidas pela dieta de cafeteria e o tratamento com o Losartan melhorou estes parâmetros. Assim, sugerimos que este efeito benéfico deste fármaco, também possa ter contribuído para o restabelecimento do desenvolvimento folicular das fêmeas CAF + LOS. No entanto, ainda não está claro se este efeito é direto sobre os parâmetros reprodutivos, ou indiretos, por meio do restabelecimento dos parâmetros metabólicos. Vias endócrinas, inflamatórias, neurais e celular-intrínsecas estão desreguladas na obesidade (22), e evidências sugerem que o SRA pode estar envolvido nos problemas associados com a

obesidade (15). Considerando que os efeitos benéficos do Losartan sobre a ovulação estão associados ao papel protetor contra o acúmulo de gordura, a resistência à insulina e o aumento das concentrações plasmáticas de triglicérides e LDL (6), a utilização de fármacos inibidores do SRA que melhoram a síndrome metabólica (15) poderia favorecer indiretamente a fertilidade na obesidade. A redução do acúmulo das gorduras retroperitoneal e subcutânea pelo Losartan em nossos resultados, pode indiretamente ter contribuído para melhorar o desenvolvimento folicular nessas fêmeas. Além disso, a diminuição do acúmulo de gorduras provavelmente está associada com uma redução proporcional da atividade dos componentes do SRA no tecido adiposo, a qual contribui para a reserva sistêmica (27), reduzindo assim, os efeitos da Angiotensina II derivada desse tecido, além do bloqueio dos receptores  $AT_1$  pelo uso do Losartan. Experimentos adicionais estão sendo realizados em nosso laboratório para melhor esclarecer essas associações e relações de causa-efeito.

Em conclusão, nossos resultados indicam que a utilização do antagonista do receptor  $AT_1$  da Angiotensina II, Losartan, na dose e tempo utilizados, melhora o desenvolvimento folicular em ratas com obesidade induzida por dieta de cafeteria.



Tabela I - Efeito do tratamento com a dieta de cafeteria isolada ou associada à administração do Losartan, sobre o peso corporal e o peso das gorduras perigonadal, retroperitoneal e subcutânea de ratas adultas.

Grupos	CTL	CAF	CAF+LOS
Peso corporal (g)	265,4±5,8 <sup>b</sup>	320,3±9,2 <sup>a,c</sup>	269,3±17,4 <sup>b</sup>
Gordura Perigonadal (% peso corporal)	3,1±0,1 <sup>b</sup>	5,3±0,3 <sup>a</sup>	5,2±0,3 <sup>a</sup>
Gordura Retroperitoneal (% peso corporal)	1,4±0,1 <sup>b,c</sup>	2,6±0,1 <sup>a,c</sup>	2,1±0,2 <sup>a,b</sup>
Gordura Subcutânea (% peso corporal)	5,8±4,5 <sup>b</sup>	9,1±0,9 <sup>a</sup>	5,0±0,7 <sup>b</sup>

Os dados são apresentados como média ± EPM. As letras sobrescritas representam diferenças estatísticas entre os grupos: a = CTL, b = CAF e c = CAF + LOS. P<0,05. N= 15.

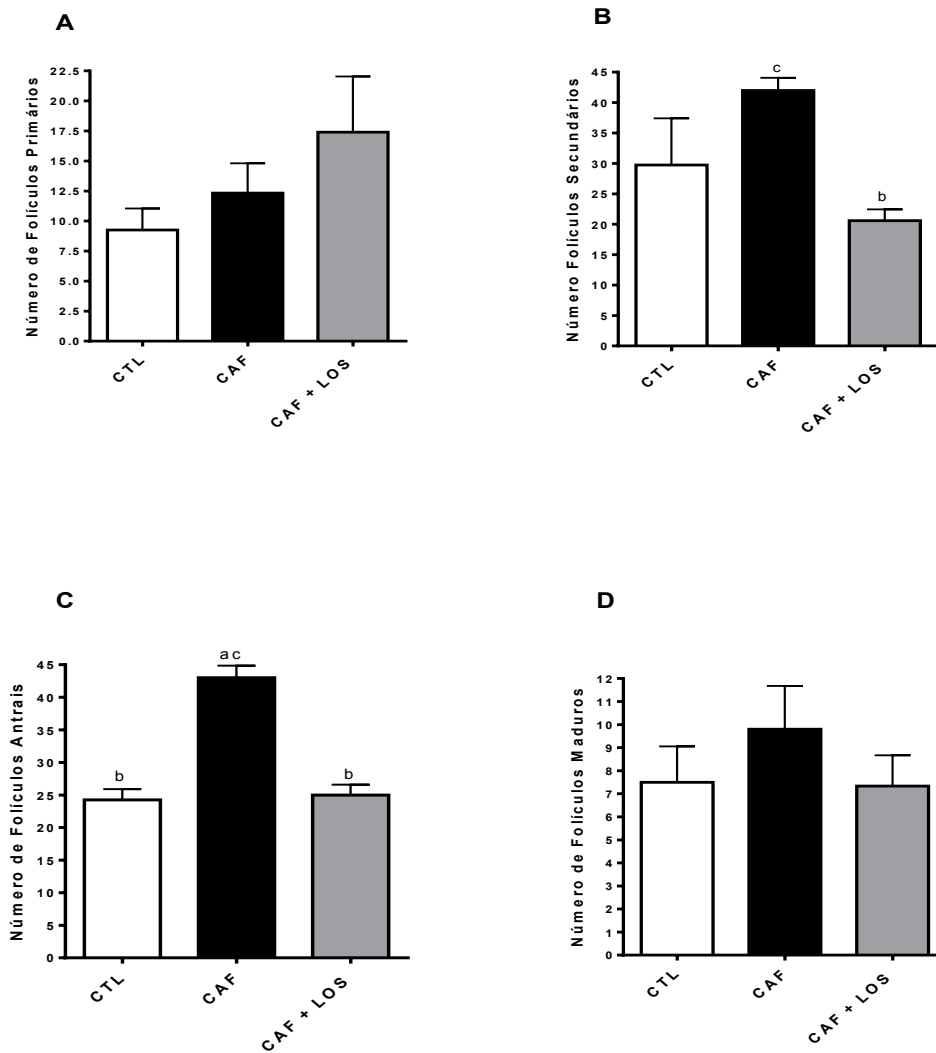


Figura I - Efeito do tratamento com a dieta de cafeteria isolada ou associada à administração do Losartan, sobre o número de folículos primários (A), secundários (B), antrais (C) e maduros (D) por ovário de ratas adultas. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. As letras sobre as colunas representam diferenças estatísticas entre os grupos: a = CTL, b = CAF e c = CAF + LOS.  $P < 0,05$ .  $N = 15$ .

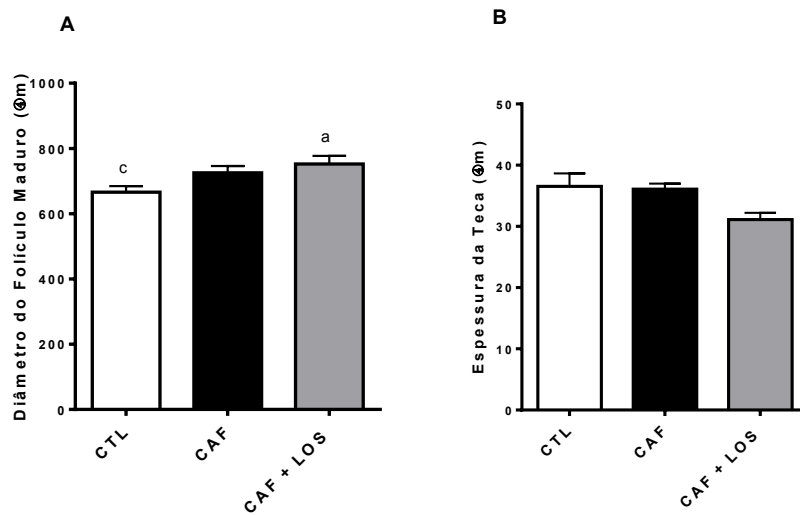


Figura II - Efeito do tratamento com a dieta de cafeteria isolada ou associada à administração do Losartan, sobre o diâmetro dos folículos maduros e sobre a espessura da camada da teca. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. As letras sobre as colunas representam diferenças estatísticas entre os grupos CTL: a = CTL, b = CAF e c = CAF + LOS.  $P < 0,05$ . N= 15.

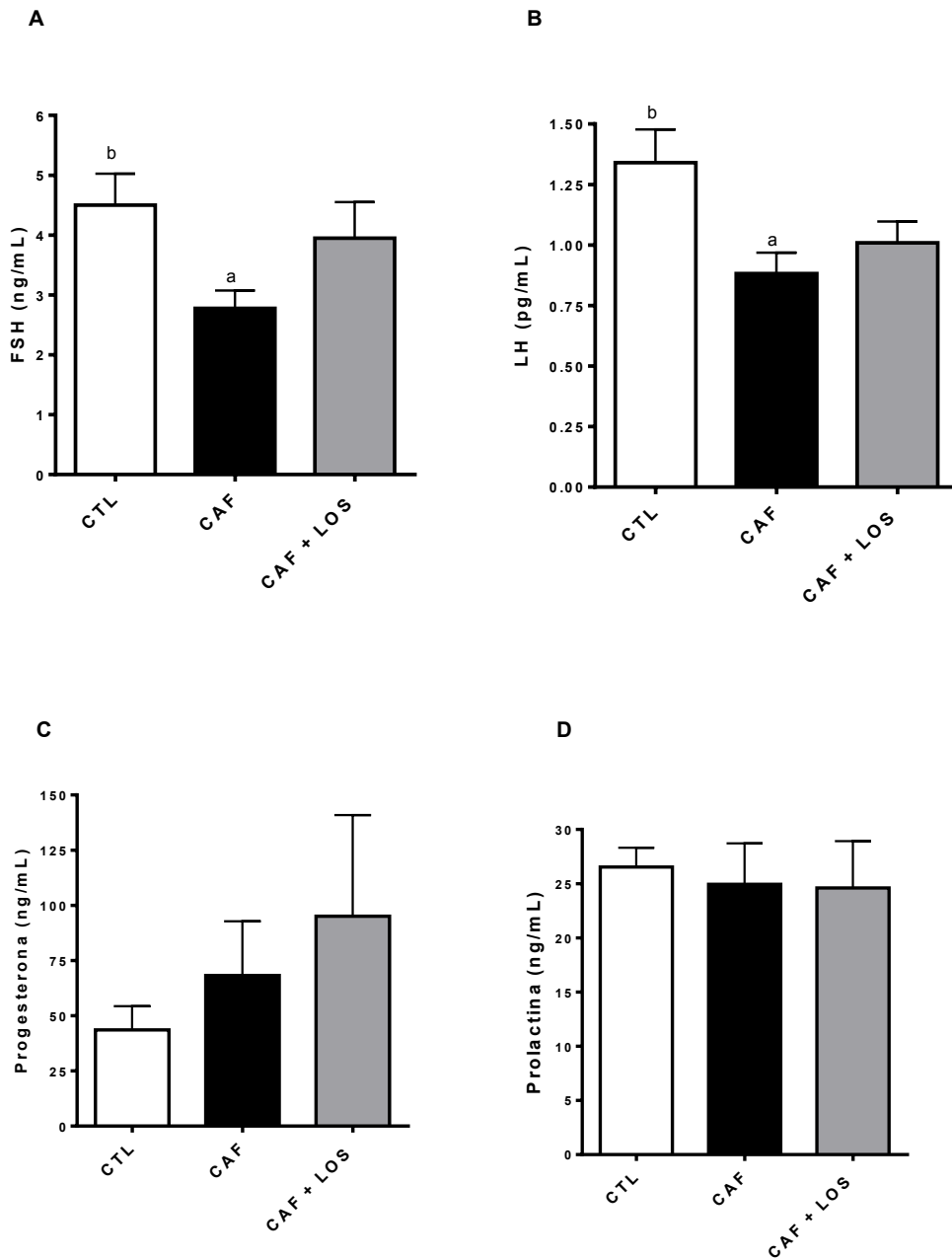


Figura III - Efeito do tratamento com a dieta de cafeteria isolada ou associada à administração do Losartan, sobre a dosagem de FSH (A), LH (B), progesterona (C) e prolactina (D) no dia da eutanásia de ratas adultas. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. As letras sobre as colunas representam diferenças estatísticas entre os grupos: a = CTL, b = CAF e c = CAF + LOS.  $P < 0,05$ .  $N = 15$ .

## Referências

1. World Health Organization. Obesity and overweight. Geneva: World Health Organization. 2013.
2. Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ. Rodent models for human polycystic ovary syndrome. *Biol Reprod.* 2012; 86(5):149-1-12.
3. Norman JE. The adverse effects of obesity on reproduction. *Reproduction.* 2010; 140 (3): 343-5.
4. Sagae SC, Menezes EF, Bonfleur ML, Vanzela EC, Zacharias P, Lubaczeuski C, et al. Early onset obesity induces reproductive deficits in female rats. *Physiol Behav.* 2012; 105(5): 1104-11.
5. Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med.* 2008; 264 (3):224-36.
6. Sagae SC, Lubaczeuski C., Zacharias P, Bonfleur ML, Franci CR, Sanvitto GL. Prevention of metabolic disorders and reproductive performance deficits by the blockade of angiotensin II AT1 receptor in female rats fed with cafeteria diet. *Physiol Behav.* 2013; 119:1-8.
7. Steel MK. A possible role for brain renin-angiotensin system in the regulation of LH secretion. *Am J Physiol.* 1983; 245(6):805-810.
8. Steel MK. Effects of angiotensin injected into various brain áreas on luteinizing hormone release in female rats. *Neuroendocrinology.* 1987; 46(5):410-5.
9. Lightman A, Tarlatzis BC, Rzasa PJ, Culler MD, Caride VJ, Negro-Vilar AF et al. The ovarian renin-angiotensin system renin-like activity and angiotensin II III immunoreactivity in gonadotropin-stimulate and unstimulated human follicular fluid. *Am J Obstet Gynecol.* 1987; 156(4):808-16.
10. Yoshimura Y. The ovarian Renin-angiotensin system in reproductive physiology. *Front Neuroendocrinol.* 1997; 18:247-91.
11. World Health Organization Chronicle. 1985; 39(2):51-6.
12. Landgraf SS, Wengert M, Silva JS, Zapata-Sudo G, Sudo RT, Takiya CM et al. Changes in angiotensin receptors expression. Play a pivotal role in the renal damage observed in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011; 300(2):F499-510.
13. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol.* 2002; 62:609-14.

14. Lara HE, Dissen GA, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JL et al. An increased intraovarian synthesis of growth factor and its affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in rat. *Endocrinology*. 2000; 141(3):1059-72.
15. Putnam K, Shoemaker R, Yiannikouris F, Cassis LA. The renin-angiotensin system: a target of and contributor to dyslipidemias, altered glucose homeostasis, and hypertension of the metabolic syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012; 302(6):H1219-30. Review.
16. Smith PM, Hindmarch CC, Murphy D, Ferguson AV. AT1 receptor blockade alters nutritional and biometric development in obesity-resistant and obesity-prone rats submitted to a high fat diet. *Front Psychol*. 2014; 29; 5:832.
17. Pountain SJ, Pipkin FB, Hunter MG. The ontogeny of components of the renin-angiotensin system in the porcine fetal ovary. *Anim Reprod Sci*. 2010; 117(1-2):119-26.
18. Miyamoto A, Shirasuna K, Shimizu T, Bollwein H, Schams D. Regulation of corpus luteum development and maintenance: specific roles of angiogenesis and action of prostaglandin F<sub>2</sub>α. *Soc Reprod Fertil Suppl*. 2010; 67:289-304.
19. Franks S. Polycystic ovary syndrome: Approaching the millennium. *Hum Reprod*. 1997; 12:43–45.
20. Tena G, Moran C, Romero R, Moran S. Ovarian morphology and endocrine function in polycystic ovary syndrome. *Arch Gynecol Obstet*. 2011; 284(6):1443-8.
21. Jin-Ju P, Chun S, Baik-Dong C, Soon-Jeong J, Guanlin W, Do-Seon L, et al. Induction of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in estradiol valerate (EV) induced polycystic ovary. *Arch Pharm Res*. 2011; 34(8): 1389-97.
22. Qatanani M, Lazar M. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes & Development*. 2007; 21(12): 1443–55.
23. Arefi S, Mottaghi S, Sharifi AM. Studying the correlation of renin-angiotensin-system (RAS) components and insulin resistance in polycystic ovary syndrome (PCOs). *Gynecol Endocrinol*. 2013; 29:1–4.
24. Carriere PD, Brawer JR, Farookhi R. Alterations in gonadotropin-release hormone-dependent gonadotropin in rats with polycystic ovaries. *Biol Reprod*. 1991; 45(5):685-90.
25. McNatty KP, Reader K, Smith P, Heath DA, Juengel JL. Control of ovarian follicular development to the gonadotrophin-dependent phase: a 2006 perspective. *Soc Reprod Fertil Suppl*. 2007; 64:55-68.

26. Ahtiainen P, Rulli S, Pakarainen T, Zhang FP, Poutanen M, Huhtaniemi I. Phenotypic characterization on mice with exaggerated and missing Lh/hCG action. *Mol Cell Endocrinol.* 2007; 260-262:255-63.
27. Kalupahana NS, Massiera F, Quignard-Boulangé A, Ailhaud G, Voy BH, Wassarman DH, et al. Overproduction of angiotensinogen from adipose tissue induces adipose inflammation, glucose intolerance, and insulin resistance. *Obesity (Silver Spring).* 2012; 20(1):48-56.

## **ANEXO I**

Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal e Aulas Práticas –  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná.



Anexo I. Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal e Aulas Práticas



Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

**Certificado Experimental no Uso de Animais em Pesquisa**  
**Nº 21/2013 – CE**

O projeto de pesquisa intitulado “Efeito da dieta de cafeteria sobre a expressão de receptores de Ang II em folículos ovarianos de ratas Wistar adultas”, sob a coordenação do prof (a) Sara Cristina Sagae., registrado no CEUA/Unioeste sob número de protocolo 02/12, foi aprovado e executado segundo os princípios éticos de experimentação animal.

Cascavel, 10/12/2013

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'L. Fariña', is written over a faint circular stamp.

Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña  
Coordenadora do CEUA  
Portaria nº 2861/2012-GRE

**ANEXO II.**

Normas do Periódico

Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia

Print version **ISSN** 0100-7203

<http://www.scielo.br/revistas/rbgo/pinstruc.htm>

## Escopo e política

A Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia (Rev Bras Ginecol Obstet., ISSN 0100 7203), publicação mensal de divulgação científica da Federação das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia (Febrasgo), é dirigida a obstetras, ginecologistas e profissionais de áreas afins, com o propósito de publicar contribuições originais sobre temas relevantes no campo da Ginecologia, Obstetrícia e áreas correlatas. É aberta a contribuições nacionais e internacionais. A revista aceita e publica trabalhos em português, inglês e espanhol.

O material enviado para análise não pode ter sido submetido simultaneamente à publicação em outras revistas nem publicado anteriormente. Na seleção dos manuscritos para publicação, são avaliadas originalidade, relevância do tema e qualidade da metodologia utilizada, além da adequação às normas editoriais adotadas pela revista. O material publicado passa a ser propriedade da Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia e da Febrasgo, só podendo ser reproduzido, total ou parcialmente, com a anuência dessas entidades.

Os manuscritos submetidos à revista são analisados por pareceristas e o sigilo sobre a autoria e a identidade dos revisores é garantido durante todo o processo de edição. Os pareceres dos revisores e as instruções do editor serão enviados para os autores para que eles tomem conhecimento das alterações a serem introduzidas. Os autores devem reenviar o texto com as modificações solicitadas assim que possível, devendo justificar, na carta de encaminhamento, se for o caso, o motivo do não atendimento de alguma sugestão para modificação. Não havendo retorno do trabalho após três meses, presume-se que os autores não têm mais interesse na publicação. Os autores podem solicitar em qualquer ponto do processo de análise e edição do texto a sustação do processo e a retirada do trabalho. Os conceitos e as declarações contidos nos artigos são de responsabilidade dos autores.

A revista publica contribuições nas seguintes categorias:

Artigos Originais, trabalhos completos prospectivos, experimentais ou retrospectivos. Manuscritos contendo resultados de pesquisa clínica ou experimental original têm prioridade para publicação.

Relatos de Casos, de grande interesse e bem documentados, do ponto de vista clínico e laboratorial. Os autores deverão indicar na carta de encaminhamento os aspectos novos ou inesperados em relação aos casos já publicados. O texto das seções Introdução e Discussão deve ser baseado em revisão bibliográfica atualizada. O número de referências pode ser igual ao dos trabalhos completos.

Técnicas e Equipamentos, para apresentação de inovações em diagnóstico, técnicas cirúrgicas e tratamentos, desde que não sejam, clara ou veladamente, propaganda de drogas ou outros produtos. Valem para essa categoria todas as normas aplicadas para trabalhos completos.

Artigos de Revisão, incluindo avaliação crítica e sistematizada da literatura, meta-análises ou revisões sistemáticas. A seleção dos temas e o convite aos autores têm como base planejamento estabelecido pela editoria. Contribuições espontâneas podem ser aceitas. Nesse caso, devem ser enviados inicialmente um resumo ou roteiro do texto, a lista de autores e as respectivas publicações sobre o tema. Se houver interesse da revista, será enviado convite para apresentação do texto definitivo. Todos os autores devem ter publicações em periódicos regulares, indexados sobre o tema da revisão. O número de autores é limitado a quatro, dependendo do tipo de texto e da metodologia empregada. Devem ser descritos os métodos e procedimentos adotados para a obtenção do texto, que deve ter como base referências recentes, inclusive do ano em curso. Tratando-se de tema ainda sujeito a controvérsias, a revisão deve discutir as tendências e as linhas de investigação em curso. Apresentar, além do texto da revisão, resumo, abstract e conclusões. Ver a seção "Preparo do manuscrito" para informações quanto ao texto principal, página de rosto, resumo e abstract;

Comentários Editoriais, solicitados pelo editor;

Resumos de Teses apresentadas e aprovadas nos últimos 12 meses, contados da data de envio do resumo. Devem conter, aproximadamente, 300 palavras e, para serem aceitos, devem seguir as normas da revista quanto à estruturação, à forma e ao conteúdo. Incluir título em português e inglês e, no mínimo, três palavras ou expressões-chave. Não há revisão do texto dos Resumos de Teses. No arquivo enviado, informar: nome completo do autor e do orientador; membros da banca; data de apresentação e a identificação do serviço ou departamento onde a tese foi desenvolvida e apresentada. Lembramos que a publicação do resumo não impede a posterior publicação do trabalho completo em qualquer periódico.

Cartas dos Leitores para o Editor, versando sobre matéria editorial ou não, mas com apresentação de informações relevantes ao leitor. As cartas podem ser resumidas pela editoria, mas com manutenção dos pontos principais. No caso de críticas a trabalhos

publicados, a carta é enviada aos autores para que sua resposta possa ser publicada simultaneamente.

## Forma e preparação de manuscritos

### Informações gerais

A revista não aceita material editorial com objetivos comerciais.

Conflito de interesses: devem ser mencionadas as situações que podem influenciar de forma inadequada o desenvolvimento ou as conclusões do trabalho. Entre essas situações, menciona-se a participação societária nas empresas produtoras das drogas ou dos equipamentos citados ou utilizados no trabalho, assim como em concorrentes da mesma. São também consideradas fontes de conflito os auxílios recebidos, as relações de subordinação no trabalho, as consultorias etc.

No texto, deve ser mencionada a submissão e a aprovação do estudo por um Comitê de Ética em Pesquisa reconhecido pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Artigo que trate de pesquisa clínica com seres humanos deve incluir a declaração, na seção Métodos, de que os sujeitos do estudo assinaram o termo de consentimento livre e informado. Os autores devem informar, também, que a pesquisa foi conduzida de acordo com a Declaração de Helsinque revisada em 2008.

No caso de trabalhos envolvendo experimentação animal, os autores devem indicar na seção Métodos que foram seguidas as normas contidas no CIOMS (Council for International Organization of Medical Sciences) Ethical Code for Animal Experimentation (WHO Chronicle 1985; 39(2):51-6) e os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA ([www.cobea.org.br](http://www.cobea.org.br)).

Todos os ensaios controlados aleatórios (randomized controlled trials) e clínicos (clinical trials) submetidos à publicação devem ter o registro em uma base de dados de ensaios clínicos. Essa é uma orientação da Plataforma Internacional para Registros de Ensaios Clínicos (ICTRP) da Organização Mundial da Saúde (OMS), e do International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). As instruções para o registro estão disponíveis no endereço eletrônico do ICMJE ([http://www.icmje.org/clin\\_trialup.htm](http://www.icmje.org/clin_trialup.htm)) e o registro pode ser feito na base de dados

de ensaios clínicos da National Library of Medicine, disponível em <http://clinicaltrials.gov/ct/gui>.

O número de autores de trabalhos completos e relatos de casos é limitado a sete. Trabalhos de autoria coletiva (institucionais) devem ter os responsáveis especificados. Trabalhos e estudos multicêntricos podem ter número de autores compatível com o número de centros (cada situação será avaliada pela editoria e pelos revisores). Os investigadores responsáveis pelos protocolos aplicados devem ser especificados. Todos os autores devem ter conhecimento do texto enviado para a revista.

O conceito de coautoria é baseado na contribuição de cada um, para a concepção e planejamento do trabalho, análise e interpretação dos dados, para a redação ou revisão crítica do texto. A inclusão de nomes cuja contribuição não se enquadre nos critérios citados ou que tenham fornecido apenas suporte material não é justificável.

Os autores serão informados, por correspondência eletrônica, do recebimento dos trabalhos. Os trabalhos que estiverem de acordo com as Instruções aos Autores e se enquadram na política editorial da revista serão enviados para análise por revisores indicados pelo editor. Os originais em desacordo com os objetivos da revista ou com essas instruções são devolvidos aos autores para as adaptações necessárias antes da avaliação pelo Conselho Editorial ou recusados sem análise por revisores.

Junto dos arquivos originais, deve ser enviada uma carta de encaminhamento, na qual deve ficar explícita a concordância com as normas editoriais, com o processo de revisão e com a transferência de copyright para a revista.

Para manuscritos originais, não ultrapassar 25 páginas de texto digitado ou aproximadamente 30.000 caracteres. Limitar o número de tabelas e figuras ao necessário para apresentação dos resultados que são discutidos (como norma geral, limitar a cinco). Para manuscritos do tipo Relato de Caso, não ultrapassar 15 páginas de texto ou 18.000 caracteres (ver "Preparo do manuscrito", "Resultados").

O trabalho deve ser enviado pelo sistema de submissão online no portal SciELO. O endereço eletrônico de todos os autores deve ser fornecido. Desta forma, os coautores receberão informação sobre a submissão do trabalho e, assim, não será necessária a assinatura de todos na carta de encaminhamento. O endereço eletrônico para correspondência com a revista é [rbgo@fmrp.usp.br](mailto:rbgo@fmrp.usp.br). O arquivo correspondente ao trabalho deve ser único e deve conter texto, referências, tabelas e figuras.

Preparo dos manuscritos

As normas que seguem foram baseadas no formato proposto pelo ICMJE e publicado no artigo "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical

Journals", atualizado em Outubro de 2008 e disponível no endereço eletrônico: <http://www.icmje.org/>.

### Apresentação do texto

Os trabalhos devem ser digitados em espaço 2 em todas as seções, da página de rosto às referências bibliográficas, tabelas e legendas. Cada página deve conter aproximadamente 25 linhas em uma coluna. Usar preferencialmente o processador de texto Microsoft Word® e a fonte Times New Roman 12. Não dar destaque a trechos do texto: não sublinhar ou usar negrito. Numerar todas as páginas, iniciando pela de rosto.

Não usar maiúsculas nos nomes próprios (a não ser a primeira letra) no texto ou nas referências bibliográficas. Não utilizar pontos nas siglas (DPP em vez de D.P.P.). Quando usar siglas ou abreviaturas, descrevê-las por extenso na primeira vez que mencionadas no texto. Iniciar cada seção em uma nova página: página de rosto; resumo e palavras ou expressões-chave; abstract e keywords; texto; agradecimentos; referências; tabelas individuais e legendas das figuras.

### Página de rosto

Apresentar o título do trabalho em português e em inglês; nomes completos dos autores sem abreviaturas; endereços eletrônicos válidos de todos os autores (opcional, em substituição à carta de encaminhamento); nome da instituição onde o trabalho foi desenvolvido; afiliação institucional dos autores; informações sobre auxílios recebidos sob forma de bolsas de estudos, financiamento, fornecimento de drogas, reagentes ou equipamentos. Obrigatoriamente deve ser fornecido o endereço da instituição onde o trabalho foi desenvolvido, o qual é publicado na página inicial do trabalho. Devem ser indicados nome, endereço, telefone/fax e e-mail do autor para o qual a correspondência deve ser enviada. Essas informações pessoais são empregadas apenas para correspondência com a revista e somente são publicadas se houver pedido do(s) autor(es).

### Resumo

O resumo do trabalho deve aparecer na segunda página. Para trabalhos completos, redigir um resumo estruturado, que deve ser dividido em seções identificadas:

objetivo, métodos, resultados e conclusões. Deve ter aproximadamente 300 palavras. O resumo deve conter as informações relevantes, permitindo que o leitor tenha uma ideia geral do trabalho. Deve incluir descrição resumida de todos os métodos empregados e da análise estatística efetuada. Expor os resultados numéricos mais relevantes, e não apenas indicação de significância estatística. As conclusões devem ser baseadas nos resultados do trabalho e não da literatura. Evitar o uso de abreviações e símbolos. Não citar referências bibliográficas no resumo.

Abaixo do texto do resumo indicar o número de registro e/ou identificação para os ensaios controlados aleatórios e ensaios clínicos (ver item 5 das "Informações Gerais").

Na mesma página do resumo, citar pelo menos três palavras ou expressões-chave que serão empregadas para compor o índice anual da revista. Devem ser baseadas nos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) publicado pela Bireme, que é uma tradução do Medical Subject Headings (MeSH) da National Library of Medicine e está disponível no endereço eletrônico: <http://decs.bvs.br>.

O abstract deve ser versão fiel do texto do resumo estruturado (purpose, methods, results e conclusions). Deve ser também acompanhado da versão para o inglês das palavras ou expressões-chave (keywords). O resumo e o abstract dos Relatos de Casos e dos Artigos de Revisão e de Atualização não devem ser estruturados e são limitados a 150 palavras.

## Introdução

Repetir, na primeira página da introdução, o título completo em português e inglês. Nessa seção, mostre a situação atual dos conhecimentos sobre o tópico em estudo, divergências e lacunas que possam eventualmente justificar o desenvolvimento do trabalho, mas sem revisão extensa da literatura. Para Relatos de Casos, apresentar um resumo dos casos já publicados, epidemiologia da condição relatada e uma justificativa para a apresentação como caso isolado. Expor claramente os objetivos do trabalho.

## Métodos



Iniciar essa seção indicando o planejamento do trabalho: se prospectivo ou retrospectivo; ensaio clínico ou experimental; se a distribuição dos casos foi aleatória ou não etc. Descrever os critérios para seleção das pacientes ou Grupo Experimental, inclusive dos Controles. Identificar os equipamentos e reagentes empregados (fabricante, cidade e país). Se a metodologia aplicada já tiver sido empregada, indicar as referências, além da descrição resumida do método. Descrever também os métodos estatísticos empregados e as comparações para as quais cada teste foi empregado.

Os trabalhos que apresentam como objetivo a avaliação da eficácia ou a tolerabilidade de tratamentos ou drogas devem, necessariamente, incluir Grupo Controle adequado. Para informações adicionais sobre o desenho de trabalhos desse tipo, consultar ICH Harmonized Tripartite Guideline - Choice of Control Group and Related Issues in Clinical Trials ([http://www.hc-sc.gc.ca/hpfb-dgpsa/tpd-dpt/e10\\_e.html](http://www.hc-sc.gc.ca/hpfb-dgpsa/tpd-dpt/e10_e.html)). Ver também itens 4 e 5 das "Informações Gerais".

## Resultados

Apresentar os resultados em sequência lógica, no texto, nas tabelas e nas figuras. Expor os resultados relevantes para o objetivo do trabalho e que são discutidos. Não repetir no texto dessa seção todos os dados das tabelas e figuras, mas descrever e enfatizar os mais importantes, sem interpretação dos mesmos (ver também "Tabelas"). Nos Relatos de Casos, as seções "Métodos" e "Resultados" são substituídas pela "Descrição do caso", mantendo-se as demais.

## Discussão

Devem ser realçadas as informações novas e originais obtidas na investigação. Não repetir dados e informações já mencionados nas seções "Introdução" e "Resultados". Evitar citação de tabelas e figuras. Ressaltar a adequação dos métodos empregados na investigação. Comparar e relacionar suas observações com as de outros autores, comentando e explicando as diferenças. Explicar as implicações dos achados, suas limitações e fazer as recomendações decorrentes. Para Relatos de Casos, basear a discussão em ampla e atualizada revisão da literatura. As informações sobre os casos já publicados podem ser tabuladas e exibidas nessa seção para comparações.

## Agradecimentos

Dirigidos a pessoas que tenham colaborado intelectualmente, mas cuja contribuição não justifica coautoria, ou para aquelas que tenham provido apoio material.

## Referências

Todos os autores e trabalhos citados no texto devem constar dessa seção e vice-versa. Numerar as referências bibliográficas por ordem de entrada no trabalho e usar esses números para as citações no texto. Evitar número excessivo de referências, selecionando as mais relevantes para cada afirmação e dando preferência para os trabalhos mais recentes. Não empregar citações de difícil acesso, como resumos de trabalhos apresentados em congressos, teses ou publicações de circulação restrita (não indexados). Não empregar referências do tipo "observações não publicadas" e "comunicação pessoal". Artigos aceitos para publicação podem ser citados acompanhados da expressão: "aceito e aguardando publicação" ou "in press", indicando-se periódico, volume e ano. Trabalhos aceitos por periódicos que estejam disponíveis online, mas sem indicação de fascículos e páginas, devem ser citados como "ahead of print".

Outras publicações dos autores (autocitação) devem ser empregadas apenas se houver necessidade clara e forem relacionadas ao tema. Nesse caso, incluir entre as referências bibliográficas apenas trabalhos originais publicados em periódicos regulares (não citar capítulos ou revisões).

O número de referências bibliográficas deve ser aproximadamente 35. Os autores são responsáveis pela exatidão dos dados constantes das referências bibliográficas.

Para todas as referências, citar os autores até o sexto. Se houver mais de seis autores, citar os seis primeiros, seguidos da expressão et al., conforme os seguintes modelos:

## Formato impresso

### Artigos em revistas

Ceccarelli F, Barberi S, Pontesilli A, Zancla S, Ranieri E. Ovarian carcinoma presenting with axillary lymph node metastasis: a case report. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2011;32(2):237-9.

Jiang Y, Brassard P, Severini A, Goleski V, Santos M, Leamon A, et al. Type-specific prevalence of Human Papillomavirus infection among women in the Northwest Territories, Canada. *J Infect Public Health*. 2011;4(5-6):219-27.

Artigos com título em inglês e texto em português ou outra língua

Utilizar o título em inglês, entre colchetes e no final da referência, indicar a língua na qual o artigo foi publicado.

Prado DS, Santos DL. [Contraception in users of the public and private sectors of health]. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2011;33(7):143-9. Portuguese.

Taketani Y, Mizuno M. [Application of anti-progesterone agents for contraception]. *Rinsho Fujinka Sanka*. 1988;42(11):997-1000. Japanese.

Livro

Baggish MS, Karram MM. Atlas of pelvic anatomy and gynecologic surgery. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 2006.

Capítulos de livro

Picciano MF. Pregnancy and lactation. In: Ziegler EE, Filer LJ, editors. Present knowledge in nutrition. Washington (DC): ILSI Press; 1996. p. 384-95.

Formato eletrônico

Apenas para informações estatísticas oficiais e citação de referências de periódicos não impressos. Para estatísticas oficiais, indicar a entidade responsável, o endereço eletrônico, o nome do arquivo ou entrada. Incluir o número de tela, data e hora do

acesso. Termos como "serial", "periódico", "homepage" e "monography", por exemplo, não são mais utilizados. Todos os documentos devem ser indicados apenas como [Internet]. Para documentos eletrônicos com o identificador DOI (Digital Object Identifier), este deve ser mencionado no final da referência, além das informações que seguem:

Brasil. Ministério da Saúde. DATASUS [Internet]. Informações de Saúde. Estatísticas vitais. Mortalidade e nascidos vivos: nascidos vivos desde 1994. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2008. [citado 2007 Fev 7]. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sinasc/cnv/nvuf.def>>.

#### Monograph on the Internet or e-book

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available at: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>.

#### Tabelas

Apresentar as tabelas em páginas separadas, com espaço duplo e preferencialmente fonte Arial 8. A numeração deve ser sequencial, em algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. Todas as tabelas devem ter título e todas as colunas da tabela devem ser identificadas com um cabeçalho. A legenda deve conter informações que permitam ao leitor entender o conteúdo das tabelas e figuras, mesmo sem a leitura do texto do trabalho. As linhas horizontais devem ser simples e limitadas a duas no topo e uma no final da tabela. Não empregar linhas verticais. Não usar funções de criação de tabelas, comandos de justificação, tabulações decimais ou centralizadas. Utilizar comandos de tabulação (tab) e não o espaçador para separar as colunas e, para nova linha, a tecla enter. No rodapé da tabela, deve constar legenda para abreviaturas e testes estatísticos utilizados.

#### Figuras (gráficos, fotografias e ilustrações)

As figuras devem ser apresentadas em páginas separadas e numeradas sequencialmente, em algarismos arábicos, conforme a ordem de aparecimento no texto. Todas as figuras devem ter qualidade gráfica adequada e apresentar título e

legenda. Para evitar problemas que comprometam o padrão da revista, o processo de digitalização de imagens (scan) deve obedecer aos seguintes parâmetros: para gráficos ou esquemas, usar 300 dpi/bitmap para traço; para ilustrações e fotos (preto e branco), usar 300 dpi/RGB ou grayscale. Em todos os casos, os arquivos devem ter extensão .tif e/ou .jpg. Também são aceitos arquivos com extensão .xls (Excel), .eps, .psd para ilustrações em curva (gráficos, desenhos e esquemas). São aceitas, no máximo, cinco figuras. Se as figuras já tiverem sido publicadas, devem vir acompanhadas de autorização por escrito do autor/editor e constando a fonte na legenda da ilustração.

## Legendas

Digitar as legendas usando espaço duplo, acompanhando as respectivas figuras (gráficos, fotografias e ilustrações). Cada legenda deve ser numerada em algarismos arábicos, correspondendo a cada figura, e na ordem em que foram citadas no trabalho.

## Abreviaturas e siglas

Devem ser precedidas do nome completo quando citadas pela primeira vez no texto. Nas legendas das tabelas e figuras, devem ser acompanhadas de seu nome por extenso. As abreviaturas e as siglas não devem ser usadas no título dos artigos e nem no resumo.

## Envio dos manuscritos

O trabalho deve ser enviado pelo sistema de submissão online no portal SciELO <http://submission.scielo.br/index.php/rbgo/login>.

Outras correspondências deverão ser enviadas para:

Jurandyr Moreira de Andrade

Editor

Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia - Editoria - Avenida Bandeirantes, 3.900, 8º andar - Campus Universitário - CEP 14049-900 - Ribeirão Preto (SP) - Fone: (16) 3602-2803 - Fax: (16) 3633-0946 - E-mail: rbgo@fmrp.usp.br.

Itens para a conferência do manuscrito

Antes de enviar o manuscrito, conferir se as Instruções aos Autores foram seguidas e verificar o atendimento dos itens listados a seguir:

carta de encaminhamento assinada por todos os autores (escaneada e anexada como documento suplementar ou enviada pelo correio) ou informação dos endereços eletrônicos válidos de todos os autores na página de rosto;

citação da aprovação do projeto do trabalho por Comissão de Ética em Pesquisa, assinatura do termo de consentimento livre e informado (na seção "Métodos") e informação sobre o atendimento das exigências para pesquisa em animais;

número ou código do registro do estudo, se necessário, na página de rosto (item 5 das "Informações Gerais");

conflito de interesses: informar se há ou não. Se houver, explicar sem omissão de informações relevantes;

página de rosto com todas as informações solicitadas;

resumo e abstract estruturados e compatíveis com o texto do trabalho;

três ou mais palavras-chave relacionadas ao texto e respectivas keywords baseadas no Decs;

verificar se todas as tabelas e figuras estão corretamente citadas no texto e numeradas, e se as legendas permitem o entendimento das mesmas;

referências bibliográficas: numeradas na ordem de aparecimento e corretamente digitadas. Verificar se todos os trabalhos citados estão na lista de referências e se todos os listados estão citados no texto.