



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia

Obesidade e reprodução em fêmeas: modulação pela Angiotensina II

Tese de doutorado

Sara Cristina Sagae

Porto Alegre, 2010



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia

Obesidade e reprodução em fêmeas: modulação pela Angiotensina II

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

Sara Cristina Sagae

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Luiz Sanvitto

Porto Alegre, 2010

À família

Dedico

*“A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério.
É uma emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e de toda arte”
Albert Einstein*

*“Quando morremos, nada pode ser levado conosco, com a exceção das sementes
lançadas por nosso trabalho e por nosso conhecimento”
Dalai Lama*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por sempre ter me concedido saúde, disposição, perseverança e amor em todos os dias de trabalho e estudos.

Ao meu orientador, **Dr. Gilberto Luiz Sanvito**, pela confiança dispensada desde o início do desenvolvimento dessa tese, por compartilhar seus conhecimentos e por estar sempre à disposição para ajudar e aconselhar.

Ao prof. **Dr. Celso Rodrigues Franci**, pelas dosagens hormonais e apoio teórico.

Aos membros da banca examinadora, **Dra. Ilma S. Brum da Silva, Dr. Cândido Coimbra e Dra. Helena Corletta** pela atenção e essencial colaboração.

Ao prof. **Dr. Aldo Bolten Lucion**, que mesmo um pouco distante, manteve sua presença e auxílios constantes.

Ao meu marido **Irapuan**, que, através do amor, cultivou a paciência e a compreensão. Agradeço pelo grande esforço na busca de nossa felicidade, por cada flor, por cada árvore, por cada abraço. Obrigada pelas brincadeiras, risadas, palavras e bilhetes de carinho, pelos passeios, e principalmente por você existir em minha vida.

À minha mãe, **Helene**, que floresceu minha vida por polinizá-la com religião e amor, lição de vida e fonte inesgotável de carinho e generosidade.

Ao meu pai, **Mário**, que frutificou meu caminho por semeá-lo com conselhos e incentivo aos estudos, exemplo de perseverança e dignidade.

Aos meus queridos irmãos **Osmar, Tânia e Regina** (*in memoriam*) e **Sérgio, Airton, Francisco, Marino** e minha “irmã-gêmea” **Tânia** por me permitirem ter o grande privilégio de sua convivência e amor e aos meus amados sobrinhos pela alegria que trazem para nossa vida.

Aos pais **Irapuan e Dete**, pelo amor, carinho e respeito, por estarem sempre presentes e por nos ajudar a transpor os obstáculos com muita força.

Aos irmãos **Karlinha, Karin, Gordo, Lu e Paulo** pela amizade e pelos bons momentos vividos juntos e aos bem-vindos sobrinhos por trazerem felicidade e prosperidade para a família.

Às minhas companheiras de trabalho **Maria Lúcia, Sandra Balbo, Ana Carla, Helaine e Margarete** pelo grande e constante apoio, essenciais para o desenvolvimento dessa tese.

À Emerielle, pelas dosagens de insulina.

Às alunas de iniciação científica **Patrícia e Camila**, pelo árduo trabalho e contribuição.

Ao colega prof. **Paulino**, pelo auxílio nas dosagens no HU.

Ao meu grande amigo **Charlis** pelos bons momentos de convivência e aprendizado durante a Pós-Graduação, pelas sugestões e por sempre se disponibilizar a ajudar, mesmo com tantos compromissos.

À minha amiga **Andréa**, pelos inesquecíveis momentos e pelo companheirismo.

Aos amigos **Carmen, Ana Lúcia e Márcio**, pessoas especiais com quem convivi no mestrado e com os quais tive a grande alegria de reencontrar durante o doutoramento.

Aos queridos **Everson, Lígia e Marcelo**, que fizeram parte da minha jornada e que sempre me auxiliaram.

Aos amigos de linha de pesquisa, **Kika, Jéferson e Silvana**, e aos demais colegas do Laboratório de Neuroendocrinologia do Comportamento **Karin, Marcinha, Vanise, Bruno, Adolfo, Carol, Camila, Charles, Marcelo H., Rosana, Ana Raquel, Natália e Osni**, agradeço pelo carinho e pelo apoio sempre que precisei.

Aos inigualáveis e amados **Neguinho, Hukana, Xalita, Princes, Zovira, Guliver, Deno, Branca, Ruminavão, Farol, Denta, Loro, Dentinha, Buvinu, Rumi, Hippie, Gato, Pullover e Delegado**, pelos preciosos momentos de descontração.

À **Universidade Estadual do Oeste do Paraná**, por possibilitar o meu afastamento integral para qualificação, na busca pela verticalização da qualidade do ensino e da pesquisa em nossa universidade.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia** pela oportunidade de novamente fazer parte deste curso.

Às secretárias do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Unioeste, **Jaque, Carmen e Grazélia** e do PPG-Fisiologia **Silvia, Alice, Lucas e Fabiana** por sempre se disponibilizarem a ajudar.

À **Fundação Araucária de Apoio à Pesquisa**, pelos auxílios bolsa e deslocamento, que foram fundamentais para a conclusão dessa tese.

A todos aqueles, que, de uma forma ou outra, contribuíram para o desenvolvimento e para a conclusão desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
APRESENTAÇÃO	
LISTA DE TABELA E FIGURAS	
ABREVIATURAS	
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A obesidade.....	2
1.1.1. Modelos de obesidade – a dieta da cafeteria.....	3
1.2. Função reprodutiva de ratas.....	5
1.2.1: A puberdade.....	5
1.2.2. O ciclo estral.....	6
1.2.3. Desenvolvimento folicular e esteroidogênese.....	7
1.2.4. Perfil dos hormônios reprodutivos durante o ciclo estral.....	9
1.2.5. Comportamento sexual da rata – o reflexo de lordose.....	11
1.2.6. A ovulação.....	12
1.3. Obesidade e reprodução feminina.....	13
1.4. Angiotensina II (Ang II).....	15
1.5. Sistema renina-angiotensina (SRA) e obesidade.....	16
1.6. Angiotensina II e reprodução em fêmeas.....	18
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. Objetivo geral.....	22
2.2. Objetivos específicos.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. Animais.....	24
3.2. Dietas.....	24
3.3 Administração de losartan.....	26
3.4. Grupos experimentais.....	26
3.4.1. Experimento 1: Efeito da dieta da cafeteria, introduzida a partir do desmame, sobre processos reprodutivos em ratas.....	26
3.4.2. Experimento 2: Efeito da associação da administração de losartan com a dieta da cafeteria, introduzidos a partir do desmame, sobre processos reprodutivos em ratas.....	26
3.5. Análises da instalação da puberdade e ciclo estral.....	27
3.6. Canulação da veia jugular.....	27
3.7. Comportamento sexual.....	27
3.8. Coleta de sangue e dosagem dos hormônios reprodutivos.....	28
3.9. Contagem do número de oócitos.....	29
3.10. Teste intravenoso de tolerância à glicose (ivGTT).....	29
3.11. Dosagem de triglicérides, colesterol total, HDL e LDL.....	30
3.12. Análises Estatísticas.....	31
4. RESULTADOS.....	32
4.1. Experimento 1: Efeito da dieta da cafeteria, introduzida a partir do desmame, sobre processos reprodutivos em ratas.....	33
4.2. Experimento 2: Efeito da associação da administração de losartan com a dieta da cafeteria, introduzidos a partir do desmame, sobre parâmetros reprodutivos em ratas.....	43
5. DISCUSSÕES.....	56
5.1 Experimento 1: Efeito da dieta da cafeteria introduzida a partir do desmame sobre processos reprodutivos em ratas.....	57

5.2 Experimento 2: Efeito da associação da administração de losartan com a dieta da cafeteria, introduzidos a partir do desmame, sobre processos reprodutivos em ratas.....	68
6. CONCLUSÕES.....	77
6.1. Experimento 1: Efeito da dieta da cafeteria, introduzida a partir do desmame, sobre processos reprodutivos em ratas.....	78
6.2. Experimento 2: Efeito da associação da administração de losartan com a dieta da cafeteria, introduzidos a partir do desmame, sobre processos reprodutivos em ratas.....	78
7. PERSPECTIVAS.....	79
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
9. ANEXOS.....	95
9.1. Certificado de aprovação do projeto "Obesidade e reprodução em fêmeas: modulação da Angiotensina II" pelo Comitê de ética na experimentação animal e aulas práticas - UNIOESTE.....	96
9.2. Artigo submetido à revista Journal of Endocrinology intitulado "Early onset obesity induced alterations in reproductive parameters in female rats....."	97
9.3. Artigo a ser submetido intitulado "Blockade of angiotensin II AT ₁ receptor improves reproductive performance in obese female rats	124

RESUMO

A prevalência do sobrepeso e da obesidade está aumentando rapidamente no mundo e está presente em indivíduos de todas as faixas etárias, incluindo em crianças, e seus efeitos deletérios tendem a se prolongar até a vida adulta. Um dos modelos experimentais utilizados para se estudar os efeitos da obesidade é a dieta da cafeteria, com alimentos ricos em calorias. O acúmulo de gordura corporal tem sido implicado em distúrbios da função reprodutiva feminina. Resultados prévios evidenciaram uma instalação da puberdade precoce, alterações no ciclo reprodutivo e nas concentrações plasmáticas dos hormônios envolvidos no controle da reprodução e, em consequência, redução na ovulação e ciclos anovulatórios em mulheres e ratas que apresentam sobrepeso ou são obesas. A Angiotensina II (Ang II) tem sido relacionada com alterações patológicas associadas à obesidade e está envolvida no controle da reprodução feminina. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi investigar uma possível participação da Ang II, através da administração intraperitoneal (*ip*) diária a partir do desmame do antagonista losartan do receptor AT₁ de Ang II sobre parâmetros reprodutivos, incluindo a instalação da puberdade, o ciclo estral, o comportamento sexual, a ovulação e o perfil dos esteróides gonadais, do hormônio luteinizante (LH) e da prolactina ao longo da tarde do proestro em ratas submetidas à ingestão da dieta da cafeteria a partir do desmame. Para avaliar os efeitos da dieta da cafeteria sobre o metabolismo, realizamos a medida do peso das gorduras retroperitoneal e perigonadal, das concentrações de triglicérides e colesterol total, HDL (lipoproteína de alta densidade) e LDL (lipoproteína de baixa densidade) e realizamos um teste intravenoso (*iv*) de tolerância à glicose (*iv*GTT). O presente estudo confirmou dados obtidos em outros protocolos experimentais sobre a antecipação na data da instalação da puberdade e a redução na ovulação de fêmeas obesas, provavelmente induzida pela ausência dos picos de progesterona e do LH. Essas fêmeas apresentaram aumento de gorduras corporais, resistência à insulina, elevadas concentrações de triglicérides e LDL e redução no HDL. A administração crônica de losartan evitou a redução na ovulação verificada nas fêmeas do grupo cafeteria, assim como dos picos de LH e de progesterona na tarde do proestro. O losartan parece evitar parcialmente a instalação da puberdade precoce e prolonga ainda mais a fase de diestro 2 do ciclo estral induzidas pela dieta da cafeteria. O comportamento sexual das ratas não foi alterado pelo antagonista do receptor AT₁ de Ang II. Esses resultados sugerem que a associação da administração precoce do antagonista losartan de Ang II em ratas submetidas à dieta da cafeteria a partir do desmame, previne a obesidade, da resistência à insulina e do aumento de triglicérides e colesterol LDL. O bloqueio dos receptores de Ang II ainda parece contribuir para a antecipação da puberdade e do prolongamento do ciclo estral observado nas fêmeas submetidas à dieta da cafeteria e contribui para inibir os efeitos da dieta sobre o pico pré-ovulatório de LH e de progesterona.

ABSTRACT

The prevalence of overweight and obesity is increasing rapidly in the world and encompasses individuals of all ages, including children, and its deleterious effects tend to extend to adulthood. One of the experimental models used to study the obesity effects is the cafeteria diet offered to rodents with the objective to develop obesity by the intake of foods rich in calories. Studies have shown that the intake of hypercaloric diets like cafeteria diet induces body fat storage, insulin resistance and improvement of triglycerides and cholesterol levels. Fat pad storage has been implicated in female reproductive disfunctions. Previous results evidenced a precocious onset of puberty, alterations in reproductive cycle and in plasma levels of hormones involved in the control of reproduction as well as a reduction on ovulation and anovulatory cycles in obese or overweight women and female rats. The Angiotensin II (Ang II) has been related to deleterious alterations associated with obesity and studies shown an involvement of Ang II in the control of female reproduction. In this manner, the objective of this work was to investigate a possible participation of Ang II, through the diary intraperitoneal (*ip*) administration from weaning of the AT₁ receptor antagonist losartan, on the effect of the intake of cafeteria diet offered in early life on reproductive parameters, including the onset of puberty, estrous cycle, sexual behavior, ovulation rates and the profile of the gonadal steroids, luteinizing hormone (LH) and prolactin through the proestrous afternoon in female rats. To verify the effects of the cafeteria diet on the metabolism, we measure the retroperitoneal and perigonadal fat pad weights, the triglycerides and total cholesterol, HDL (high density lipoprotein) and LDL (high density lipoprotein) and we realized an intravenous (*iv*) glucose tolerance test (*iv*GTT). The present study confirmed data obtained in other experimental protocols on the earlier onset of puberty and a reduction of ovulation rates in female rats submitted to cafeteria diet, probably due to the absence of the preovulatory surge on proestrous afternoon of progesterone and of LH observed in this group. These females presented higher fat pads weights, insulin resistance, elevated levels of triglycerides and LDL and reduced levels of HDL. Losartan administration avoided the reduction in ovulation verified in females of cafeteria group, as well as the LH surge on proestrous afternoon. Losartan seems to prevent partially the precocious onset of puberty and promotes and additional increase in the phase 2 of diestrous induced by cafeteria diet. Sexual behavior of female rats was not altered by the antagonist of AT₁ receptor of Ang II. These results suggest that the association of precocious administration of antagonist losartan of Ang II in female rats submitted to cafeteria diet since weaning, inhibits the occurrence of fat pad storage, of insulin resistance and of the improvement of triglycerides and cholesterol LDL levels. The Ang II seems to contribute to the earlier onset of puberty and to the prolongation of the estrous cycle of female submitted to cafeteria diet and the administration of losartan revert the inhibitory effects of the cafeteria diet on preovulatory LH and progesterone surges and, in consequence, the ovulation rates of these female rats is reestablished.

APRESENTAÇÃO

Esta tese foi estruturada em 2 experimentos. No experimento 1 avaliamos o efeito da dieta da cafeteria, introduzida a partir do desmame, sobre o ciclo reprodutivo de ratas. No experimento 2 avaliamos o efeito da associação da administração de losartan com a dieta da cafeteria introduzidos a partir do desmame sobre parâmetros reprodutivos em ratas. Em ambos os experimentos, pretendíamos avaliar o efeito do início a partir do desmame e com duração prolongada até a vida adulta destas intervenções (dieta da cafeteria isolada e dieta da cafeteria associada à administração de losartan).

Nesse trabalho, a dieta da cafeteria foi utilizada para induzir um aumento do conteúdo de gordura corporal e alterações metabólicas, normalmente associadas a esse aumento. Assim, para avaliarmos o impacto da dieta da cafeteria, medimos o peso corporal, o acúmulo de gordura corporal, as variações nas concentrações de glicose e insulina em resposta à administração de glicose, o perfil de ingestão alimentar e os níveis de colesterol e triglicérides das ratas.

Os parâmetros reprodutivos analisados foram a instalação da puberdade, o ciclo estral, o comportamento sexual na noite do proestro, a ovulação na manhã do estro e o perfil dos hormônios estradiol, progesterona, LH e prolactina na tarde do proestro. As mesmas metodologias foram empregadas para o estudo destes parâmetros nos dois experimentos.

LISTA DE TABELA E FIGURAS

Tabela 1. Conteúdo nutricional da ração padrão para ratos e dos componentes da dieta da cafeteria....	25
Figura 1. Fotomicrografia das fases do ciclo estral de ratas com ciclos regulares. Os esfregaços foram coletados entre 8:00 e 10:00 horas da manhã. A: Proestro; B: Estro; C: Diestro 1; D: Diestro.....	2
Figura 2. Concentrações plasmáticas (média ± E.P.M.) de progesterona, prolactina, estradiol, hormônio luteinizante e hormônio folículo-estimulante obtidas em intervalo de 2 horas nas quatro fases do ciclo estral de ratas. O traço mais largo no eixo horizontal representa o período escuro do ciclo diário claro-escuro.....	10
Figura 3. Fotomicrografia do oviduto direito de rata com ciclo estral regular na manhã do estro. O ovário foi retirado, colocado entre duas lâminas de vidro e analisado ao microscópio óptico. As setas indicam a localização dos oócitos.....	13
Figura 4. Descrição visual dos comportamentos de lordose pela fêmea (A) e monta pelo macho (B) durante filmagem de comportamento sexual.....	28
Figura 5. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria a partir do desmame sobre o peso das gorduras perigonadal (A) e retroperitoneal (B) (g / 100 g de peso corporal) de ratas Wistar aos 30 dias de vida. Resultados expressos como média ± E.P.M. *diferentes estatisticamente significativas entre os grupos controle (CTL) e cafeteria (CAF).....	33
Figura 6. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria a partir do desmame sobre o peso das gorduras perigonadal (A) e retroperitoneal (B) (g / 100 g de peso corporal) de ratas Wistar adultas. Resultados expressos como média ± E.P.M. *diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle (CTL) e cafeteria (CAF).....	33
Figura 7. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria a partir do desmame sobre a ingestão alimentar (g) e sobre a ingestão de energia (Kcal) a cada dois dias de ratas Wistar. Resultados expressos como média ± E.P.M. dos grupos controle (CTL) e cafeteria (CAF).....	34
Figura 8. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria a partir do desmame sobre a evolução do peso corporal (g) a cada dois dias de ratas Wistar. Resultados expressos como média ± E.P.M. dos grupos controle (CTL) e cafeteria (CAF).....	35
Figura 9. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria a partir do desmame sobre as concentrações plasmáticas (A) e AUC (B) de insulina (ng/mL) e sanguíneas (C) e AUC (D) de glicose (mg/dL) de ratas Wistar adultas 1 minuto antes e 15 minutos, 30 minutos e 60 minutos após a administração iv de glicose (1,5 g / kg peso corporal). HOMA-IR representado na figura 9E. Resultados expressos como média ± EPM. *diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle (CTL) e cafeteria (CAF).....	36
Figura 10. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria a partir do desmame sobre as concentrações plasmáticas de triglicérides (A), colesterol total (B), lipoproteína de alta densidade (HDL - (C)) e lipoproteína de baixa densidade (LDL - (D)) (média ± erro padrão da média - mg/dL) de ratas Wistar adultas. *diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle (CTL) e cafeteria (CAF). 37	
Figura 11. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria a partir do desmame sobre a data da abertura vaginal (média ± erro padrão da média) de ratas Wistar, *diferenças estatisticamente significativas; teste T de Student (t = 3.171, P = 0.048).....	38
Figura 12. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria a partir do desmame sobre a receptividade sexual (número de lordoses / número de montas - média ± E.P.M.) de ratas Wistar adultas dos grupos controle (CTL) e cafeteria (CAF).....	39
Figura 13. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria a partir do desmame sobre o número de oócitos de ratas Wistar adultas. Média ± E.P.M. *diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle (CTL) e cafeteria (CAF).....	39

Figura 14. Efeito da dieta da cafeteria a partir do desmame sobre as concentrações plasmáticas de estradiol ((A) pg/mL), e AUC de estradiol (B), de progesterona ((C) ng/mL) e AUC de progesterona (D), de LH ((E) ng/mL) e AUC de LH (F) e de prolactina ((G) ng/mL) e AUC de prolactina (H) na tarde do proestro de ratas Wistar adultas. As amostras de sangue foram coletadas às 13, 14, 15, 16, 17 e 18 horas. Média ± E.P.M. dos grupos controle (CTL) e cafeteria (CAF). *diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle (CTL) e cafeteria (CAF).....41

Figura 15. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria e da injeção de losartan a partir do desmame sobre o peso das gorduras perigonadal (A) e retroperitoneal (B) (g / 100 g de peso corporal) de ratas Wistar aos 30 dias de idade. Resultados expressos como média ± E.P.M. As letras sobre as colunas representam diferenças estatísticas, resultando nos seguintes grupos: (a) controle + salina (CTL + SAL), (b) controle + losartan (CTL + LOS), (c) cafeteria + salina (CAF + SAL) e (d) cafeteria + losartan (CAF + LOS). 43

Figura 16. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria e da injeção de losartan a partir do desmame sobre o peso das gorduras perigonadal (A) e retroperitoneal (B) (g / 100 g de peso corporal) de ratas Wistar adultas. Resultados expressos como média ± E.P.M. As letras sobre as colunas representam diferenças estatísticas, resultando nos seguintes grupos: (a) controle + salina (CTL + SAL), (b) controle + losartan (CTL + LOS), (c) cafeteria + salina (CAF + SAL) e (d) cafeteria + losartan (CAF + LOS).....44

Figura 17. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria e da injeção de losartan a partir do desmame sobre a ingestão alimentar (g) e sobre a ingestão de energia (Kcal) a cada dia de ratas Wistar. Resultados expressos como média ± E.P.M. dos grupos controle + salina (CTL + SAL), controle + losartan (CTL + LOS), cafeteria + salina (CAF + SAL) e cafeteria + losartan (CAF + LOS). *P < 0.05 para ingestão alimentar de CAF + SAL versus CTL + SAL; **, P < 0.05 para ingestão alimentar de CAF + LOS versus CAF + SAL. #P < 0.05 para ingestão de calorias de CAF + SAL versus CTL + SAL; ##, P < 0.05 para ingestão de calorias de CAF + LOS versus CAF + SAL.....45

Figura 18. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria e da injeção de losartan a partir do desmame sobre a evolução do peso corporal (g) a cada dois dias de ratas Wistar. Resultados expressos como média ± E.P.M. dos grupos controle + salina (CTL + SAL), controle + losartan (CTL + LOS), cafeteria + salina (CAF + SAL) e cafeteria + losartan (CAF + LOS). *P < 0.05 para CAF + SAL versus CTL + SAL; **, P < 0.05 para CAF + LOS versus CAF + SAL.....46

Figura 19. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria e da injeção de losartan a partir do desmame sobre as concentrações sanguíneas de glicose (média ± erro padrão da média - mg/dL) e sobre as concentrações plasmáticas de insulina (média ± erro padrão da média - ng/ml) de ratas Wistar adultas 1 minutos antes (A – tempo 0), 15 minutos (B – tempo 15), 30 minutos (C – tempo 30) e 60 minutos (D – tempo 60) após a administração iv de glicose (1,5 g / kg peso corporal). HOMA – IR representado nas figuras 23E.e 23F. Resultados expressos como média ± EPM. * Representam diferenças estatísticas entre os grupos.....47

Figura 20. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria e da injeção de losartan a partir do desmame sobre as concentrações plasmáticas de triglicerídeos (A), colesterol total (B), lipoproteína de alta densidade (HDL - (C)) e lipoproteína de baixa densidade (LDL – (D)) (média ± erro padrão da média - mg/dL) de ratas Wistar adultas. As letras sobre as colunas representam diferenças estatísticas, resultando nos seguintes grupos: (a) controle + salina (CTL + SAL), (b) controle + losartan (CTL + LOS), (c) cafeteria + salina (CAF + SAL) e (d) cafeteria + losartan (CAF + LOS).....49

Figura 21. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria e da injeção de losartan a partir do desmame sobre a abertura vaginal (média ± E.P.M.) de ratas Wistar. As letras sobre as colunas representam diferenças estatísticas, resultando nos seguintes grupos: (a) controle + salina (CTL + SAL), (b) controle + losartan (CTL + LOS), (c) cafeteria + salina (CAF + SAL) e (d) cafeteria + losartan (CAF + LOS).....50

Figura 22. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria e da injeção de losartan a partir do desmame sobre a receptividade sexual (número de lordoses / número de montas - média ± E.P.M.) de ratas Wistar adultas dos grupos controle + salina (CTL + SAL), controle + losartan (CTL = LOS), cafeteria + salina (CAF + SAL) e cafeteria + losartan (CAF + LOS).....51

23. Efeito da dieta da cafeteria e da injeção de losartan a partir do desmame sobre o número de oócitos de ratas Wistar adultas. Média ± E.P.M. As letras sobre as colunas representam diferenças estatísticas, resultando nos seguintes grupos: (a) controle + salina (CTL + SAL), (b) controle + losartan (CTL + LOS), (c) cafeteria + salina (CAF + SAL) e (d) cafeteria + losartan (CAF + LOS).....	52
Figura 24. Efeito da dieta da cafeteria e da injeção de losartan a partir do desmame sobre as concentrações plasmáticas de estradiol ((A e B) pg/mL), de progesterona ((C e D) ng/mL), de LH ((E e F) ng/mL) e de prolactina ((G e H) ng/mL) na tarde do proestro de ratas Wistar adultas. Média ± E.P.M. dos grupos controle + salina (CTL + SAL), controle + losartan (CTL + LOS), cafeteria + salina (CAF + SAL) e cafeteria + losartan (CAF + LOS).....	53
Figura 25. Efeito da dieta da cafeteria e da injeção de losartan a partir do desmame os AUCs de das concentrações plasmáticas de estradiol ((A e B) pg/mL), de progesterona ((C e D) ng/mL), de LH ((E e F) ng/mL) e de prolactina ((G e H) ng/mL) na tarde do proestro de ratas Wistar adultas. Média ± E.P.M. dos grupos controle + salina (CTL + SAL), controle + losartan (CTL + LOS), cafeteria + salina (CAF + SAL) e cafeteria + losartan (CAF + LOS).....	54

ABREVIATURAS

Ang II	Angiotensina II
FSH	Hormônio Folículo-estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HOMA-IR	Modelo de Acesso Homeostático – Resistência à Insulina
IMC	Índice de massa corporal
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Hormônio Luteinizante
SRA	Sistema renina-angiotensina

1. INTRODUÇÃO

1.1. A obesidade

O sobrepeso e a obesidade representam importantes problemas de saúde pública e vêm assumindo características epidêmicas (Wei *et al.* 2004). A prevalência de obesidade aumentou em todo o mundo mais de 75% desde 1980 e em consequência, mais de 1,5 bilhões de pessoas no mundo apresentam sobrepeso ou são obesas (Deitel 2003; Ogden *et al.* 2007). A urbanização, as rápidas mudanças tecnológicas e a disponibilidade de alimentos palatáveis têm alterado o modo de vida das pessoas, promovendo uma excessiva ingestão calórica e uma redução da atividade física (Loos & Bouchard 2003).

A obesidade aumenta o risco de desenvolvimento de muitas patologias, tais como alterações de pressão arterial e colesterol, asma, artrite e problemas cardiovasculares (Hill & Peters 1998; Gogia & Agarwal 2006; Lee *et al.* 2007), que diminuem a qualidade e a expectativa de vida (Hill & Peters 1998). A epidemia da obesidade, juntamente com o diabetes não-dependente de insulina ou tipo dois e a resistência à insulina, está associada à prevalência da síndrome metabólica (Zimmet *et al.* 2001; Olshansky *et al.* 2005). A hiperinsulinemia de jejum observada na resistência à insulina e no diabetes tipo dois em indivíduos obesos pode ocasionar um perfil lipídico desfavorável, como o aumento das concentrações séricas de triglicerídeos, do colesterol LDL e a diminuição do colesterol HDL (Wild *et al.* 1992; Rajkhowa *et al.* 1997). Em roedores e humanos, a sobrecarga de lipídios pode destruir as células β -pancreáticas (Lee *et al.* 2007), através do processo de lipoapoptose (Shimabukuro *et al.* 1998).

A epidemia da obesidade não se restringe a um período específico da vida e inclui crianças e adolescentes (Ogden *et al.* 2002; Miller *et al.* 2004). Fatores de risco à doença coronária como dislipidemia, hipertensão e reduzida tolerância à glicose têm sido descritas em crianças obesas, com sintomas similares aos observados em indivíduos adultos (Dietz 1994). Adicionalmente aos efeitos deletérios da obesidade durante a infância, os reflexos desses efeitos na vida adulta têm sido verificados. De fato, a sobrenutrição precoce induz o desenvolvimento de patologias na idade adulta, incluindo a

resistência à insulina (Martins *et al.* 2008), doenças cardiovasculares e o diabetes tipo dois (Dietz 1994; Weiss *et al.* 2004; Barker 2007) e a obesidade e a síndrome metabólica promovem um aumento precoce da capacidade adipogênica e lipogênica dos adipócitos (Muhlhausler & Smith 2009).

Durante a última década, tem se tornado evidente que os adipócitos são células endócrinas extremamente ativas que secretam importantes hormônios, citocinas, substâncias vasoativas e outros peptídeos. Os hormônios adipócitos-específicos são agora conhecidos como adipocinas e são ativamente envolvidos na regulação de diversas funções fisiológicas, como a homeostase energética, a sensibilidade à insulina, a inflamação, o apetite, a angiogênese e a pressão arterial. O acúmulo de tecido adiposo é uma condição para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e coexiste com a resistência à insulina (Nakamura *et al.* 1994; Grundy 1999). Por exemplo, o fator de necrose tumoral TNF-K, a resistina, adiponectina e a leptina são considerados fatores derivados do tecido adiposo relacionados à resistência à insulina em indivíduos obesos (Hotamisligil *et al.* 1993; Stepan *et al.* 2001; Ryo *et al.* 2004).

Os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da obesidade vêm sendo estudados há muitos anos, para se tentar intervir a sua instalação. Muitas moléculas que estão envolvidas na modulação do apetite e regulação do peso corporal também são alvos de estudo como a colecistocinina, serotonina, bombesina, peptídeo de liberação da gastrina, glucagon (Azziz *et al.* 2004) e neurotensina (Williams *et al.* 1991), que são moléculas que estimulam a saciedade. Por outro lado, a galanina e a norepinefrina são estimuladores do apetite (Azziz *et al.* 2004). Entretanto, tais moléculas exercem pouca influência a longo prazo, assim, outras moléculas sinalizadoras estão envolvidas na homeostase energética, como a leptina e o neuropeptídeo Y (NPY). A leptina é uma proteína plasmática produto do gene *Ob* secretada pelos adipócitos, que de acordo com sua quantidade, informa proporcionalmente ao cérebro a quantidade de tecido adiposo, inibindo a ingestão alimentar e aumentando o gasto energético (Dawson *et al.* 1997) e o NPY é um potente estimulador do apetite e redutor do gasto energético, sintetizado em neurônios hipotalâmicos situados no núcleo arqueado (Kalra *et al.* 1998).

1.1.1. Modelos de obesidade – a dieta da cafeteria

Ao longo do tempo, a obesidade vem sendo estudada, através de modelos experimentais animais, com a finalidade de esclarecer os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de patologias relacionadas à sua instalação. Entre eles incluem-se os provocados por lesões cerebrais, os de origem genética (Bray & York 1979), a lesão química de regiões hipotalâmicas induzidas por injeção de drogas (Suzuki *et al.* 1990; Segal *et al.* 1991) e a obesidade induzida por dietas hipercalóricas ou hiperlipídicas (Sclafani & Springer 1976).

As dietas ricas em calorias para indução da obesidade em modelos experimentais são utilizadas com o objetivo de se assemelhar à obesidade em humanos, comumente provocada por ingestão de alimentos ricos em calorias. A dieta da cafeteria é uma dieta de indução de obesidade e consiste de uma escolha de alimentos processados com uma elevada quantidade de gordura e/ou açúcares e sal, incluindo biscoitos, salgadinhos, chocolates, em adição à ração padrão para ratos (Prada *et al.* 2005). O termo dieta da cafeteria foi originalmente usado para designar a ingestão de uma variedade de itens característicos da alimentação ocidental (também conhecida como “Western diet”) ofertados a ratos para indução de obesidade (Sclafani & Springer 1976). Vários protocolos de oferta desta dieta são utilizados, incluindo trabalhos que iniciam a dieta 7 dias pós-parto (Dameto *et al.* 1994), aos 21 dias (a data de desmame em ratos) (Prats *et al.* 1989), ou em adultos jovens (Rothwell & Stock 1979). A duração da dieta e os itens ofertados também apresentam variações (Shafat *et al.* 2009). A dieta da cafeteria promove adaptações fisiológicas que resultam em redução na sensibilidade aos efeitos anoréxicos da leptina (Wei *et al.* 2004), hipertensão (Coatmellec-Taglioni *et al.* 2002), aumento da adiposidade e resistência à insulina em roedores (Llado *et al.* 1995; Prada *et al.* 2005).

1.2. Função reprodutiva de ratas

A semelhança com o perfil hormonal da mulher tornam a rata um excelente modelo experimental para estudos de reprodução. Desta forma, grande parte do conhecimento que possuímos, até o presente momento, sobre o controle do ciclo ovariano de vários mamíferos, cuja ovulação é espontânea, é baseado em estudos sobre o ciclo estral das ratas (Smith *et al.* 1975). A função reprodutiva das ratas inicia-se com a instalação da puberdade, caracterizada pela ocorrência da abertura vaginal e usualmente acompanhada pela primeira ovulação (Terasawa & Fernandez 2001), sendo definida como o período transiente entre a infância e a idade adulta, em que as características sexuais secundárias aparecem, o crescimento corporal ocorre e as gônadas iniciam a produção de gametas maduros capazes de fertilização (Reiter *et al.* 1975). Posteriormente à instalação da puberdade, com início próximo dos 70 dias de vida, o ciclo reprodutivo da rata tem como marco principal a ovulação e a rata, assim como a mulher, apresenta ovulação cíclica espontânea independente de alterações sazonais ou de atividade sexual. Os processos de crescimento e maturação folicular, assim como o funcionamento do corpo lúteo, são coordenados diretamente pelas gonadotrofinas e modulados pela ação dos esteróides ovarianos (Smith *et al.* 1975). O ciclo de ratas compõe um meio natural para se estudar as variações nas concentrações plasmáticas dos esteróides ovarianos e hipofisários e suas ações fisiológicas sobre o epitélio vaginal, o comportamento sexual e a ovulação.

1.2.1. A puberdade

A puberdade é promovida por eventos que iniciam no sistema nervoso central e são independentes de influências gonadais (Terasawa & Fernandez 2001). Esses eventos são dependentes de um aumento na secreção da secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Em primatas, os neurônios

GnRH estão sob inibição central tônica durante o período juvenil. Neurônios gabaérgicos parecem estabelecer impulsos inibitórios tônicos nos neurônios GnRH (Jarry *et al.* 1993), inibindo o processo puberal, evitando a secreção prematura de GnRH (Terasawa & Fernandez 2001). A ativação puberal do GnRH em fêmeas de mamíferos parece ser derivada de um aumento das influências excitatórias (Ojeda *et al.* 1980; Parent *et al.* 2003), provavelmente através da ativação da neurotransmissão glutamatérgica (van den Pol & Trombley 1993). Em ratas, a inibição central tônica parece não existir e a ativação puberal parece requerer a ativação coordenada direta de influências neuronais excitatórias como o estabelecimento de influências glutamatérgicas e de outros sistemas neuronais facilitatórios nesse período (Parent *et al.* 2003).

1.2.2. O ciclo estral

O ciclo das ratas conhecido como ciclo estral, é composto por quatro fases distintas com duração total aproximada de quatro dias (Santoro *et al.* 2004) (figura 2). O estro é o período no qual a fêmea apresenta *desejo sexual*, ou seja, ela está receptiva para o coito. Esta fase dura de 25 a 27 horas, e é durante este período, mais precisamente, durante a manhã do estro que ocorre a ovulação. Os períodos entre os estros são denominados de proestro, diestro 1 ou metaestro e diestro ou diestro 2. O proestro dura de 12 a 14 horas e precede o estro. Se não há fertilização, após o estro existe um período de recuperação denominado de diestro 1 cuja duração é de 6 a 8 horas, seguido pelo diestro 2 que dura de 55 a 57 horas, onde se reinicia a secreção de hormônios ovarianos para o próximo ciclo (Smith *et al.* 1975). Cada uma das fases do ciclo estral é facilmente determinada pela análise do tipo de células que descama do epitélio vaginal (figura 1) tecido altamente responsivo ao estradiol e a progesterona. No proestro, observa-se um número abundante de células epiteliais nucleadas, resultado da estratificação e proliferação celular induzida pelos estrógenos. No estro, a elevação de estradiol se traduzem na

corneificação celular característica dessa fase. No diestro 1, persistem poucas células corneificadas e outras nucleadas, acompanhadas por um grande número de leucócitos. No diestro 2, o esfregaço vaginal apresenta apenas um infiltrado leucocitário, sem células epiteliais, consequência da ação da progesterona (Santoro *et al.* 2004).

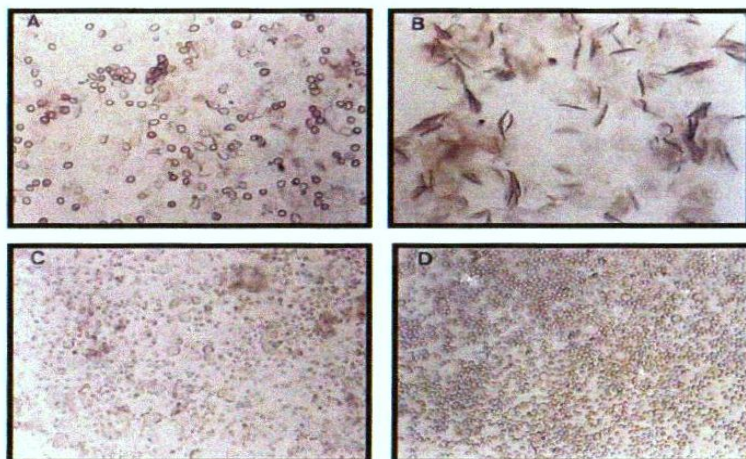


Figura 1. Fotomicrografia das fases do ciclo estral de ratas com ciclos regulares. Os esfregaços foram coletados entre 8:00 e 10:00 horas da manhã. A: Proestro; B: Estro; C: Diestro 1; D: Diestro 2.

1.2.3. Desenvolvimento folicular e esteroidogênese

Uma característica comum entre o ciclo das diferentes espécies de mamíferos é o período de crescimento folicular nos ovários. Esse crescimento é de grande importância, pois sua consequência é um aumento na produção de estrógenos e, em menor escala, na de progesterona, os quais são responsáveis por desencadear o pico pré-ovulatório de gonadotrofinas que induz a ovulação.

O processo de foliculogênese pode ser dividido em três etapas distintas, iniciando pelo desenvolvimento do folículo primordial em folículo primário e a transição deste, crescendo e formando o folículo secundário; em inicia a formação do antro e o desenvolvimento inicial do folículo pré-antral, e por fim, o seu desenvolvimento em folículo antral (SILVA *et al.*, 2009).

A progressão do desenvolvimento do folículo para o estágio antral ou pré-ovulatório é caracterizado por uma contínua proliferação das células da granulosa e da teca, aumento da vasculatura, crescimento do oócito, desenvolvimento da cavidade antral (OKTEM & OKTAY, 2008). O folículo primordial, que consiste de uma pequena célula e uma lâmina de células da granulosa achatadas, cresce e diferencia-se em um folículo antral, o folículo pré-ovulatório, que se torna maduro e é liberado no processo de ovulação. Os folículos pré-ovulatórios contêm um oócito desenvolvido e várias camadas de células da granulosa, que são envolvidas pelas células da teca. A síntese de hormônios esteróides 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 difundem-se para as células da granulosa, onde são convertidas, principalmente, a estradiol, pela ação da enzima aromatase (LUU-THE, 2001; MINDNICH et al., 2004).

Este estradiol aumentado, por sua vez, induz a síntese de receptores para FSH nos folículos, promovendo a proliferação das células da granulosa, o que resulta em maior produção de aromatase e em consequência, maior produção de estrógenos. Assim, no decurso da fase folicular, vai se estabelecendo uma alça de retroalimentação positiva no próprio ovário, resultando em um aumento lento e gradual da secreção de estradiol até chegar na fase ovulatória, quando atinge suas concentrações máximas, enquanto as concentrações de progesterona e andrógenos permanecem reduzidas (Anselmo-franci & Szawka, 2005).

À medida que o folículo se aproxima do final da fase antral do desenvolvimento (folículo pré-ovulatório), por ação do FSH e estrógenos, as células da granulosa passam a sintetizar receptores para LH. Como essas células apresentam baixa atividade da enzima C17,20-liase (que converte progestágenos a andrógenos), estas passam a produzir quantidades aumentadas de progesterona, além de manterem a conversão de andrógenos a estrógenos (Anselmo-franci & Szawka, 2005).

1.2.4. Perfil dos hormônios reprodutivos durante o ciclo estral

As gonadotrofinas, LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio foliculo-estimulante), são glicoproteínas produzidas e secretadas pela adenohipófise, em um conjunto de células especializadas denominadas gonadotrofos, e que atuam na regulação da função ovariana (Clayton & Catt 1981). No ciclo estral, as concentrações de LH e FSH permanecem reduzidas durante quase todo o ciclo. A secreção de LH aumenta antes da ovulação, o que chamamos de “pico pré-ovulatório”. Assim, no início da tarde do proestro, ocorre um aumento nas concentrações de LH e FSH que culmina com um pico no fim da tarde do proestro, sendo o pico de LH responsável pela indução da ovulação algumas horas depois. As concentrações de LH e FSH retornam aos valores basais na metade da manhã do estro. Já as concentrações de estradiol são reduzidas entre o estro e a manhã do diestro 1 e começam a aumentar a partir da tarde do diestro 1, atingindo seus maiores valores perto do meio dia do proestro e retornando aos valores basais no início da madrugada do estro. A progesterona apresenta um pico de origem folicular na tarde do proestro quase que simultaneamente ao pico de LH e retorna a valores basais na manhã do estro. Além disso, um segundo pico, de origem luteal, inicia ao meio dia do diestro 1, mantendo-se na madrugada do diestro 2 e reduzindo aos valores basais no início da manhã do diestro 2. Por fim, a prolactina também apresenta um pico pré-ovulatório, na tarde do proestro, juntamente com o pico de gonadotrofinas (Butcher *et al.* 1974; Smith *et al.* 1975; Gomes *et al.* 1999) (figura 2).

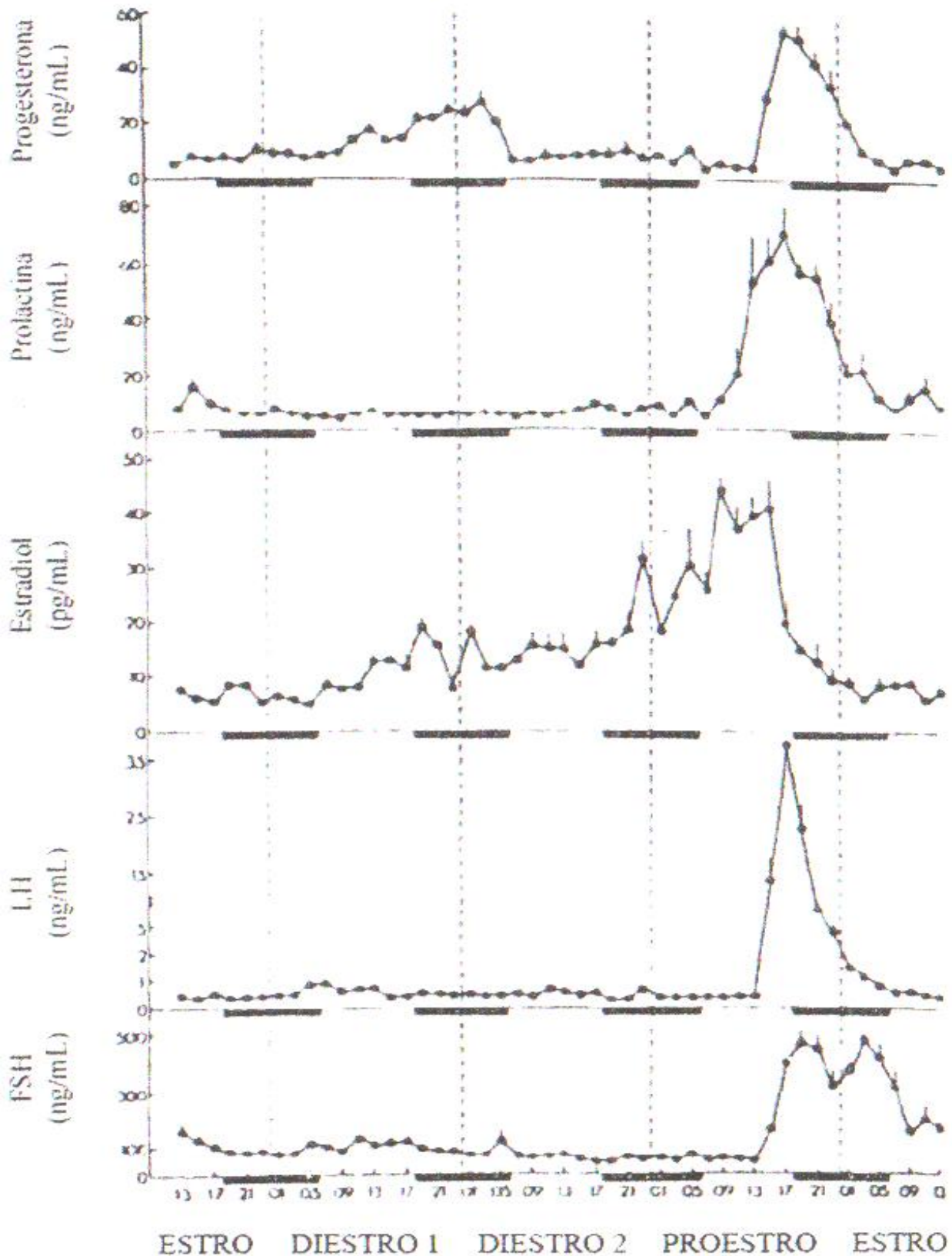


Figura 2 – Concentrações plasmáticas (média \pm E.P.M.) de progesterona, prolactina, estradiol, hormônio luteinizante e hormônio foliculo-estimulante obtidas em intervalo de 2 horas nas quatro fases do ciclo estral de ratas. O traço mais largo no eixo horizontal representa o período escuro do ciclo diário claro-escuro (Adaptado de Smith *et al.* 1975).

1.2.5. Comportamento sexual da rata – o reflexo de lordose

Durante o ciclo estral normal da rata, as alterações hormonais induzem o aparecimento de uma série de comportamentos que indicam a receptividade da fêmea, os quais incluem investigação dos genitais do macho, pequenas corridas e saltos, vocalizações e contatos físicos efêmeros, além da expressão do comportamento de lordose (Ellingsen & Agmo 2004).

O reflexo de lordose é uma postura estereotipada adotada pela fêmea receptiva em resposta à estimulação tátil do macho através do seu comportamento de monta (Truitt *et al.* 2003). A lordose é a característica mais proeminente da receptividade sexual da fêmea, e portanto, é um importante parâmetro para avaliação dessa receptividade. Este comportamento auxilia a intromissão peniana e resulta da ativação de um circuito neural dependente da regulação pelos esteróides gonadais (Flanagan-Cato *et al.* 2001; Sepilian & Nagamani 2005). Dessa forma, a retirada dos ovários abole o comportamento sexual, sendo a sua reinstalação possível apenas após a reposição com estradiol e progesterona. Apesar da ação do estradiol sobre o núcleo ventromedial do hipotálamo ser crucial para a promoção deste comportamento (Mathews & Edwards 1977; Pleim *et al.* 1989), o tratamento isolado com estradiol induz somente alguns aspectos do comportamento sexual, como a lordose, enquanto o tratamento com estradiol seguido de progesterona induz o conjunto de comportamentos proprioceptivos na sua totalidade (Auger 2001; Sepilian & Nagamani 2005).

Além dos esteróides gonadais, a prolactina também exerce influência sobre o comportamento sexual (Smith *et al.* 1975). Evidências sugerem que o bloqueio do pico pré-ovulatório de prolactina na tarde do proestro diminui a receptividade sexual, apontando uma função estimulatória importante para a indução da receptividade normal em ratas ciclando (Witcher & Freeman 1985).

1.2.6. A ovulação

O ciclo reprodutivo da rata tem como marco principal o processo da ovulação. A ovulação, que é o ápice do processo de maturação folicular, depende fundamentalmente do pico pré-ovulatório de LH (Smith *et al.* 1975; Levine 1997).

Em mulheres, não é necessária alteração de GnRH para que o ciclo progrida em seus vários estágios, incluindo o pico pré-ovulatório de LH. Em ratas, no entanto, a importância do GnRH para a geração deste pico pré-ovulatório e, portanto, para a ovulação bem reconhecida (Freeman 1994; Hotchkiss J; Knobil 1994).

Este pico é regulado em ratas pelos esteróides ovarianos por meio de dois mecanismos de efeitos opostos: o de retroalimentação positiva (estimulatória) e o de retroalimentação negativa (inibitória). Durante toda a fase lútea e na maior parte da fase folicular, concentrações reduzidas ou moderadas de estrógenos são capazes de inibir a síntese e a liberação de GnRH e de gonadotrofinas por meio do clássico mecanismo de retroalimentação negativa, reduzindo a frequência e a amplitude dos pulsos de GnRH. Essa inibição pode ser realizada diretamente sobre os neurônios GnRH, indiretamente via neurotransmissores inibitórios ou modificando a interação desses neurônios com as células gliais. O estradiol ainda induz a síntese de receptores para progesterona nesses neurônios (Smith *et al.* 1975; Hotchkiss J; Knobil 1994; Levine 1997; Herbison 1998). Na fase folicular, as concentrações de estrógenos aumentam gradualmente e estimulam, na hipófise, a proliferação de gonadotrofos, a síntese de receptores para o GnRH e para os próprios estrógenos e a síntese, não a liberação, de LH, o que causa um aumento no seu conteúdo hipofisário. Nesse período, o estrógeno aumenta a síntese de GnRH, sendo máxima na manhã no proestro, quando há aumento de estrógenos. Esse aumento na síntese de GnRH não é acompanhado por um aumento da sua liberação, pois os estrógenos estimulam ao mesmo tempo interneurônios inibitórios dos neurônios GnRH, o que causa um aumento no seu estoque hipotalâmico. Na fase ovulatória, o folículo dominante passa a secretar progesterona, além da grande quantidade de

estrógenos. Nesse período, considerado como “período crítico”, ocorre um aumento adicional de síntese de GnRH e a sua liberação, o mesmo ocorrendo na adeno-hipófise com as gonadotrofinas. Dessa forma, com o aumento de progesterona, após a pré-exposição a elevadas concentrações de estradiol, o pico pré-ovulatório de GnRH e de gonadotrofinas é deflagrado (Freeman 1994; Hotchkiss J; Knobil 1994; Levine 1997; Herbison 1998; Micevych *et al.* 2003). Ratas com ciclo estral regular apresentam, geralmente, uma ovulação na manhã do estro, com um número de oócitos entre 10 e 14 a cada ciclo (Gomes *et al.* 1999)(figura 3).

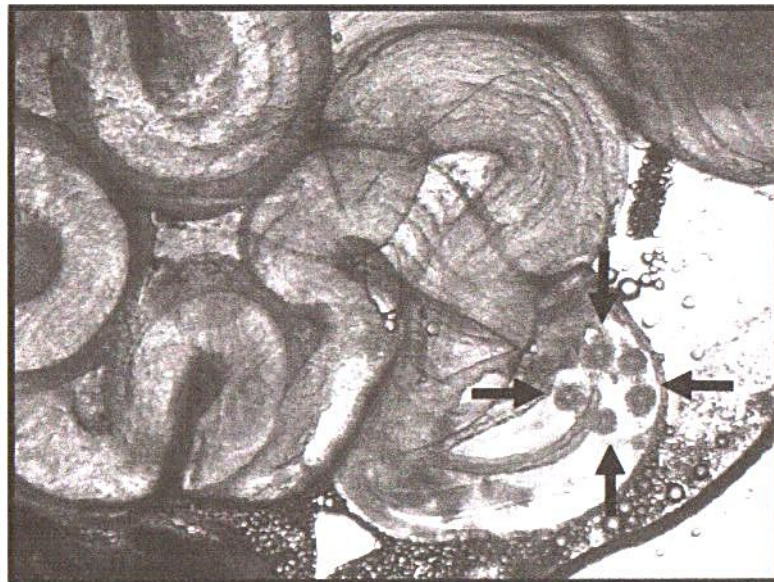


Figura 3. Fotomicrografia do oviduto direito de rato com ciclo estral regular na manhã do estro. O ovário foi retirado, colocado entre duas lâminas de vidro e analisado ao microscópio óptico. As setas indicam a localização dos oócitos.

1.3. Obesidade e reprodução feminina

Observações clínicas têm sugerido há muito tempo que existe uma forte relação entre a adiposidade e a fertilidade feminina. Um estudo (Mitchell & Rogers 1953) demonstrou que 43% das mulheres afetadas por desordens menstruais, infertilidade e abortos apresentavam sobrepeso ou eram obesas. Estudos posteriores em ratas (Kennedy & Mitra 1963) e em mulheres (Frisch & McArthur 1974)

demonstraram que uma quantidade mínima de gordura corporal era necessária para o início e manutenção dos ciclos ovulatórios (Frisch 1987). Na realidade, parece haver uma quantidade crítica de tecido adiposo para o início e a manutenção da atividade do sistema reprodutivo feminino. Por um lado, meninas excessivamente magras comumente demonstram atrasos na menarca e amenorréia (Wilkerson 1984; Golden & Shenker 1994). No outro extremo, o excesso de gordura tem sido associado com a redução da fertilidade. A obesidade afeta a função reprodutiva precocemente na vida, tanto antes quanto durante o desenvolvimento puberal. A infertilidade está fortemente associada ao excesso de gordura corporal precoce (Lake *et al.* 1997) e a obesidade antecipa a data da instalação da puberdade em ratas (Frisch *et al.* 1975) e em meninas (Ibanez *et al.* 1998; Farooqi *et al.* 2001).

O excesso de gordura corporal aumenta a disfunção ovulatória, a resistência à insulina e a hiperandrogenia em mulheres que apresentam ovário policístico (Rittmaster *et al.* 1993). Mulheres com a síndrome do ovário policístico e com elevado índice de gordura corporal apresentam aumento na frequência de pulsos de LH, mas com amplitude reduzida (Taylor *et al.* 1997; Jain *et al.* 2007). Associações independentes do ovário policístico, no entanto, têm sido demonstradas em mulheres entre a obesidade e menstruações irregulares associadas a ciclos anormais e longos e anovulação (Mitchell & Rogers 1953; Hartz *et al.* 1979; Friedman & Kim 1985; Norman & Clark 1998; Bolumar *et al.* 2000; Santoro *et al.* 2004; Jain *et al.* 2007). A obesidade também promove redução no número de gravidez (Fedorcsak *et al.* 2001; Lintsen *et al.* 2005) e afeta o endométrio, a implantação e o desenvolvimento fetal (Loveland *et al.* 2001; Kaaks *et al.* 2002; Hall & Neubert 2005), aumentando desta forma, o risco de abortos (Bohrer & Kemmann 1987; Kiddy *et al.* 1992; Pettigrew & Hamilton-Fairley 1997), independente da síndrome do ovário policístico (Shimabukuro *et al.* 1998). Mulheres com sobrepeso ou obesas apresentam uma menor chance de sucesso durante tratamentos de infertilidade (Carrell *et al.* 2001; Koloszar *et al.* 2002) e o acréscimo do número de mulheres obesas está associado ao aumento de requerimentos de tratamento para infertilidade (Rich-Edwards *et al.* 2002), e de hospitalizações durante a

gestação (Fridstrom *et al.* 1999; Michlin *et al.* 2000), promovendo aumento no custo ao sistema de saúde (Galtier-Dereure *et al.* 2000).

A fertilidade envolve complexos fatores e mecanismos de origem ovariana e extra-ovariana e a obesidade deve interferir com muitas funções neuroendócrinas e ovarianas, reduzindo tanto a ovulação quanto a fertilidade. O aumento de peso e gordura corporais está associado com várias anormalidades no balanço dos esteróides sexuais. Tais alterações envolvem andrógenos e estrógenos e sua proteína carreadora, a globulina de ligação aos esteróides sexuais (SHBG). O tecido adiposo é um sítio de ativa produção de andrógenos (Pasquali *et al.* 2006) e é um local de ativa conversão de andrógenos a estrógenos e de interconversão de estrógenos a andrógenos, que são intensamente dependentes e diretamente proporcionais à quantidade de gordura corporal (Longcope *et al.* 1969). Além disso, mulheres obesas possuem menores concentrações de SHBG em comparação a mulheres não-obesas (Pasquali *et al.* 1993), o que parece promover hiperandrogenismo e aumento de estrógenos livres aos tecidos-alvo (Kirschner *et al.* 1982; von Schoultz & Carlstrom 1989).

Adicionalmente, dados epidemiológicos evidenciaram reduzidas concentrações de metabólitos de progesterona, bem como pulsos de LH de menor amplitude e redução nas concentrações plasmáticas de progesterona na fase lútea em mulheres obesas ou com sobrepeso sem ovário policístico (Sherman & Korenman 1974; Grenman *et al.* 1986). Exames histológicos em camundongos fêmeas obesas revelaram ainda uma redução no desenvolvimento folicular dos ovários, mas com função lútea normal e uma supressão de 50% da expressão do cDNA hipotalâmico de GnRH (Tortoriello *et al.* 2004).

1.4. Angiotensina II (Ang II)

Os componentes primários do sistema renina-angiotensina (SRA) são a renina, a enzima que cataliza a conversão proteolítica do angiotensinogênio para a angiotensina I; o angiotensinogênio, o maior substrato para renina e o precursor da Ang II; a enzima conversora de angiotensina; a dipeptidil

carboxipeptidase que converte a Ang I para o octapeptídeo Ang II e os receptores de Ang II responsáveis pela iniciação dos efeitos celulares da Ang II (Fitzsimons 1980; Wang *et al.* 2001).

A Ang II é o peptídeo mais estudado como efetor final no SRA endócrino, parácrino e autócrino (Re 1989; Baker *et al.* 1992; Hollenberg 1992). A Ang II circulante é conhecida por seus efeitos na regulação do balanço de fluidos e eletrólitos (McKinley *et al.* 1996) e na homeostase cardiovascular (Saavedra 1992), sendo assim um dos reguladores mais importantes da pressão arterial (Beevers *et al.* 2001).

Vários estudos têm demonstrado que existem pelo menos dois subtipos de receptores de Ang II (Chiu *et al.* 1989; Whitebread *et al.* 1989). Baseado nas suas propriedades farmacológicas e bioquímicas, esses dois subtipos são designados como tipo 1 (AT₁) e tipo 2 (AT₂) (Timmermans *et al.* 1993; Jöhren *et al.* 1997). Os receptores AT₁ são seletivamente bloqueados por bifenilimidazoles como o losartan (Dup 753), enquanto os receptores AT₂ são bloqueados pelas tetrahydroimidazopiridinas como o PD123177 e PD 123319 (Bumpus *et al.* 1991). As funções centrais mais conhecidas da Ang II, como a regulação da pressão, homeostase e liberação de hormônios da hipófise são mediadas pelos receptores do tipo AT₁ de Ang II (SAAVEDRA, 1992).

1.5. Sistema renina-angiotensina (SRA) e obesidade

A obesidade está relacionada à hipertrofia do tecido adiposo, que é um órgão endócrino ativo e secreta diversos hormônios, incluindo a Ang II. A Angiotensina II tem sido amplamente investigada em indivíduos com alterações patológicas associadas com a obesidade. O angiotensinogênio circulante, a renina e a atividade da enzima conversora de angiotensina são aumentados em indivíduos obesos (Licata *et al.* 1994; Umemura *et al.* 1997; Goodfriend *et al.* 1999; Engeli *et al.* 2005) e o tecido adiposo de roedores e humanos contém todos os componentes do SRA (Engeli *et al.* 1999; Engeli *et al.* 2000), incluindo angiotensinogênio (Cassis *et al.* 1998) e a enzima conversora de Ang II (Shenoy & Cassis

1997). Receptores do tipo AT₁ e AT₂ (Jones *et al.* 1997) são o tipo prevalente em adipócitos de ratos e camundongos, respectivamente, enquanto os adipócitos humanos parecem apresentar exclusivamente os receptores do tipo AT₁ (Giacchetti *et al.* 2002).

Evidências demonstram que a alteração na produção dos componentes do SRA pelos adipócitos pode contribuir para o desenvolvimento de obesidade (Engeli *et al.* 2003; Goossens *et al.* 2003) e desordens relacionadas à obesidade, incluindo hipertensão e aterosclerose (Carlson *et al.* 2000; Mundy *et al.* 2007), e resistência à insulina (Goossens *et al.* 2003; Saiki *et al.* 2009).

A Ang II induz hiperglicemia (Mihessen-Neto *et al.* 1996), pelo aumento da gliconeogênese, mediada pelo receptor AT₁ (Machado *et al.* 1998). Recentemente, foi identificado um sistema renina-angiotensina nas ilhotas pancreáticas e a administração exógena de Ang II inibiu a secreção de insulina induzida por glicose através de receptores tipo AT₁ localizados nas células β -pancreáticas e a inibição da atividade do receptor AT₁ endógeno nessas células através da injeção do antagonista losartan reduz a secreção de insulina induzida por glicose (Lau *et al.* 2004), podendo prevenir o desenvolvimento do diabetes tipo 2 em homens com hipertensão arterial e problemas cardíacos (Yusuf *et al.* 2000; Lithell *et al.* 2003; Julius *et al.* 2004) ou reduzir a hiperglicemia e a intolerância à glicose, através de uma aumento na sensibilidade à insulina (Yusuf *et al.* 2000; Dahlof *et al.* 2002). Ratos angiotensinogênio-deficientes expostos à ingestão regular de ração ou de dieta rica em gordura, exibem massa de tecido adiposo reduzida e seus adipócitos são menores e possuem menor conteúdo de triglicerídeos e atividade da sintase de ácidos graxos quando comparados com controles (Massiera *et al.* 2001). A administração de losartan reduz o peso do tecido adiposo e o tamanho dos adipócitos em camundongos diabéticos (Tomono *et al.* 2008) e a deficiência genética do receptor AT₁ de angiotensina promove atenuação de ganho de peso corporal e adiposidade (Kouyama *et al.* 2005). Além disso, inibidores da enzima de conversão de angiotensina aumentam a sensibilidade à insulina, evidenciando uma interação entre a insulina e a angiotensina II na regulação do metabolismo do tecido adiposo (Zorad *et al.* 1995).

A Ang II apresenta um papel na diferenciação dos adipócitos em humanos, reduzindo a porcentagem de adipócitos sensíveis à insulina. Por causa deste fenômeno, tem sido proposto que a capacidade de estocagem de lipídios no tecido adiposo fica reduzida e os triglicerídeos serão então acumulados em outros órgãos como o fígado e músculo esquelético, assim contribuindo para aumentar a resistência à insulina. A Ang II e/ou seus metabólitos no tecido adiposo ainda estimulam a secreção e a liberação de substâncias com ações parácrinas e autócrinas, incluindo a leptina (Zhang *et al.* 1994; Cassis *et al.* 2004).

Adicionalmente, um trabalho prévio demonstrou que a Ang II central (Porter *et al.* 2003) induz redução de peso corporal e da ingestão alimentar em ratos. No entanto, os efeitos da Ang II periférica sobre o peso corporal ainda são controversos. A injeção periférica de Ang II em ratos jovens (3 semanas) não apresenta efeito (Porter & Potratz 2004), enquanto que em ratos adultos, a administração de doses reduzidas (175 ng.kg⁻¹.min⁻¹) não altera o peso e de doses mais elevadas (200, 350 e 500 ng.kg⁻¹.min⁻¹) de Ang II induzem uma redução do peso corporal (Cassis *et al.* 1998). Na realidade, a Angiotensina II não é um peptídeo que é tipicamente associado com a regulação da ingestão alimentar e gasto energético no dia-a-dia (Azziz *et al.* 2004), entretanto, existem condições anormais onde o SRA é ativado, como em alterações cardíacas (Pedersen *et al.* 1986) e obesidade (Rincon-Choles *et al.* 2002)

1.6. Angiotensina II e reprodução em fêmeas

Tem sido demonstrado que a Ang II também apresenta papel regulatório sobre as funções do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. De fato, em ratas, a administração intracerebroventricular de Ang II afeta a secreção do LH, e seu efeito é dependente dos esteróides ovarianos, estrógenos e progesterona. Em ratas ovariectomizadas, a Ang II inibe a secreção pulsátil de LH, enquanto que em animais ovariectomizados tratados com estrógeno e progesterona, a Ang II estimula a secreção de LH (Steele *et al.* 1985). Estes efeitos são abolidos pela pré-administração de saralasin, um antagonista que bloqueia os receptores AT₁ e

AT₂ de Ang II (Steele *et al.* 1983). O estímulo da secreção de LH pela Ang II é realizado através de ações cerebrais (Steele *et al.* 1981), na área pré-óptica do Hipotálamo (Steele 1987) e mediado pela secreção de GnRH da eminência mediana (Steele *et al.* 1992).

Em várias espécies, tem sido demonstrado que o ovário contém todos os componentes do SRA (Husain *et al.* 1987; Daud *et al.* 1988). A estimulação máxima do sistema renina-angiotensina ovariano nos folículos é alcançado no período pré-ovulatório. Há um aumento intrafolicular da atividade da renina, o que desencadeia o aumento nas concentrações de Ang II nos folículos pré-ovulatórios de mulheres com ciclos normais, em resposta ao aumento de LH (Lightman *et al.* 1987). A Ang II induzida pelo LH apresenta um importante papel na ovulação e na maturação de oócitos (Yoshimura *et al.* 1992; Bellver *et al.* 2003) e parece regular a ovulação através do estímulo da síntese de prostaglandinas (Peterson *et al.* 1993; Yoshimura *et al.* 1993). As prostaglandinas, juntamente com os leucotrienos, a bradicinina e a histamina, induzem o processo de ruptura da parede do folículo e a extrusão do oócito maduro na ovulação (Espey 1992).

Estudos prévios demonstraram um aumento do conteúdo de Ang II hipotalâmico na tarde do proestro que promove a liberação de GnRH (Phillips *et al.* 1996), que por sua vez estimula o comportamento de lordose em ratas (Rajendren & Moss 1993; Wu *et al.* 2006). A amígdala medial, estrutura envolvida na execução do comportamento sexual (Coolen *et al.* 1996), expressa ambos os tipos de receptores de Ang II, AT₁ e AT₂ (Tsutsumi & Saavedra 1991; von Bohlen und Halbach & Albrecht 1998; Breigeiron *et al.* 2002).

Os efeitos da Ang II sobre o comportamento sexual são ainda controversos. Em condições fisiológicas, o bloqueio de ambos os subtipos de receptores de Ang II não altera o comportamento sexual de ratas (Ceconello *et al.*). Por outro lado, homens (Ferrario & Levy 2002) e ratos (Chan *et al.* 1999) hipertensos e diabéticos (Nomura *et al.* 2007) apresentam aumento na função sexual induzido pela administração do antagonista losartan de Ang II. Estudos revelaram ainda que em mulheres após a menopausa, a administração de Versatan, um bloqueador do receptor AT₁ de Ang II, aumentou a libido

(Fogari *et al.* 2004), sugerindo um papel na função sexual da Ang II e do receptor AT₁ sob condições patofisiológicas. Em contraste, o olmesartan, outro bloqueador do receptor AT₁, falhou em afetar o comportamento sexual em camundongos controle não diabéticos (Nomura *et al.* 2007).

Em ratos, a Ang II inibe o comportamento sexual quando injetada no sistema ventricular (Clark 1989; Keaton & Clark 1998) ou diretamente na Amígdala medial, e o bloqueio dos receptores AT₁ e AT₂ neste núcleo previne este efeito (Breigeiron *et al.* 2002). Em ratas, o bloqueio dos receptores AT₁ e AT₂ de Ang II na amígdala medial previne os efeitos inibitórios do estresse sobre o comportamento sexual (Cecconello *et al.*), no entanto, a administração periférica de losartan e PD12319 não altera o quociente de lordose de ratas em resposta aos efeitos do estresse (Donadio *et al.* 2007).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Avaliar a participação da Angiotensina II sobre os efeitos da dieta da cafeteria na função reprodutiva em ratas.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do bloqueio dos receptores AT_1 sobre os seguintes parâmetros em ratas submetidas à ingestão da dieta da cafeteria:

- a relação entre o peso corporal e os pesos das gorduras perigonadal e retroperitoneal;

- as concentrações plasmáticas de glicose e insulina em resposta à administração de glicose;

- as concentrações plasmáticas de triglicerídeos e colesterol;

- a instalação da puberdade;

- o número de oócitos liberados na manhã da fase estro do ciclo estral;

- o perfil das concentrações plasmáticas dos hormônios LH, estradiol, progesterona e prolactina na tarde do proestro;

- o comportamento sexual.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Ratas Wistar prenhas (peso corporal entre 180-350 g) provenientes do biotério central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) foram mantidas em biotério setorial do laboratório de Fisiologia e Biofísica do CCBS em caixas individuais em ambiente com ciclo claro-escuro (luzes acesas as 07:00 horas e apagadas às 19:00 horas) e temperatura controlados, com livre acesso à água e alimento. O dia do parto foi considerado como dia 0 e, aos 21 dias após o parto, foi realizado o desmame da ninhada e foram separadas apenas as fêmeas em caixas individuais em grupos de 3-5 por caixa (41 cm de comprimento X 34 cm de largura X 17 cm altura). O peso corporal (em dias alternados) e a ingestão alimentar (todos os dias) foram monitorados durante o período experimental. Para a pesagem do alimento, o restante do alimento (sobra do dia anterior) era retirado, pesado e era ofertado o alimento do dia (volume já previamente calculado). O alimento ingerido era calculado subtraindo-se o peso do alimento (dia anterior) do peso do alimento do dia e dividia-se pelo número de animais na caixa.

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da Unioeste (em anexo) e todos os procedimentos com os animais foram realizados de acordo com as normas do NIH (National Institute of Health).

3.2. Dietas

A partir dos 21 dias até a data da morte, foram ofertadas aos animais submetidos à dieta da cafeteria, adaptada de trabalho prévio (Prada *et al.* 2005), ração modificada, e alimentos adicionais. A ração modificada consistiu de pellet contendo 37,5% ração padrão, 25% amendoim torrado, 25% chocolate em barra e 12,5% bolacha de maisena e possuía 49% carboidratos, 22% proteína e 24% de gordura (mais detalhes na tabela 1). Para o preparo da ração, os ingredientes foram triturados e foi acrescentada água para fazer os pellets, que após, foram secados na estufa. Os alimentos adicionais

consistiram em salgadinhos, biscoitos e bolo pronto. A dieta da cafeteria possuía no total 5,42 Kcal/g, enquanto que a ração padrão que foi ofertada aos animais que foram utilizados como controles da dieta da cafeteria possuía 2,95 kcal/g (60% carboidratos, 22% proteína e 10% gordura – mais detalhes na tabela 1). Para os animais tratados com a dieta da cafeteria foram ofertados refrigerante sem gás e água. Aos animais que serviram como controles da dieta foram ofertados ração (NutrilabTM, Colombo, Brazil) e água. As dietas foram oferecidas diariamente no mesmo horário e os ratos tinham livre acesso a todos os componentes das dietas.

Tabela 1. Conteúdo nutricional da ração padrão para ratos e dos componentes da dieta da cafeteria.

Alimentos	Qtd (g)	Kcal	Carboidrato (g)	Proteína (g)	Lipídeo (g)	Na (mg)
Ração padrão (Nutrilab, Colombo, Brazil)	1	2,95	0,55	0,22	0,04	
wafer com chocolate (Lacta)	1	5,10	0,67	0,07	0,27	0,00
bolacha maisena (Bauducco)	1	3,80	0,63	0,05	0,08	1,86
amendoim	1	3,31	0,22	0,24	0,50	0,00
chocolate em barra (Nestlé)	1	5,48	0,64	0,00	0,32	0,00
wafer com chocolate (Nestlé)	1	5,23	0,57	0,06	0,31	1,27
Biscoito wafer (Itamaraty)	1	5,13	0,7	0,05	0,24	1,53
Salgadinhos queijo (Elma chips)	1	4,8	0,68	0,06	0,21	6,87
Salgadinhos bacon (Elma chips)	1	5,04	0,52	0,05	0,29	18,24
Refrigerante guaraná (Antarctica)	1	0,40	0,10	0,00	0,00	0,06
Refrigerante cola (Pepsi)	1	0,47	0,12	0,00	0,00	0,00
bolo pronto (Renata)	1	4,00	0,53	0,05	0,19	1,97
bolo pronto (Bauducco)	1	4,42	0,55	0,06	0,22	2,30
bolo pronto (Visconti)	1	4,38	0,52	0,08	0,22	3,00

3.3. Administração de losartan

A partir dos 21 dias, fêmeas foram submetidas à injeção intraperitoneal (*ip*) do antagonista Losartan de Ang II (10 mg/kg) diariamente e no mesmo horário, conforme utilizado em experimentos anteriores por nosso grupo de pesquisa (Donadio *et al.* 2007) para estudo de parâmetros reprodutivos em ratas. O grupo controle da injeção de losartan consistiu de injeção *ip* diária de solução salina (0,9%).

3.4. Grupos experimentais:

3.4.1. Experimento 1: Efeito da dieta da cafeteria, introduzida a partir do desmame, sobre processos reprodutivos em ratas

- a) grupo controle (CTL): ratas submetidas à dieta de ração e água do desmame até a idade adulta;
- b) grupo cafeteria (CAF): ratas submetidas à dieta da cafeteria do desmame até a idade adulta;

3.4.2. Experimento 2: Efeito da associação da administração de losartan com a dieta da cafeteria, introduzidos a partir do desmame, sobre processos reprodutivos em ratas

- a) grupo controle + salina (CTL + SAL): ratas submetidas à dieta de ração padrão e água e injeção *ip* de solução salina do desmame até a idade adulta;
- b) grupo controle + losartan (CTL + LOS): ratas submetidas à dieta de ração e água e à injeção *ip* de losartan do desmame até a idade adulta;
- c) grupo cafeteria + salina (CAF + SAL): ratas submetidas à dieta da cafeteria e à injeção *ip* de solução salina do desmame até a idade adulta;
- d) grupo cafeteria + losartan (CAF + LOS): ratas submetidas à dieta da cafeteria e à injeção *ip* de losartan do desmame até a idade adulta.

3.5. Análises da instalação da puberdade e do ciclo estral

A partir dos 21 dias após o nascimento, a ocorrência ou não da abertura vaginal das fêmeas foi verificada diariamente para verificação da data da instalação da puberdade. A partir do 70º dia de vida das fêmeas, o esfregaço vaginal foi coletado diariamente a partir das 09:00 horas, e com auxílio de um conta-gotas contendo soro fisiológico, o epitélio vaginal da fêmea era “lavado” e o material coletado era analisado a fresco ao microscópio óptico determinando em que fase do ciclo a rata se encontrava.

3.6. Canulação da veia jugular

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (Aldrich; 1 ml de 2,5% solução/ 100 g de peso corporal *i.p.*) (Poletini *et al.* 2003) e um cânula de silastic era inserida através da veia jugular direita, de acordo com a técnica de (Harms & Ojeda 1974), para realização das coletas de sangue.

3.7. Comportamento sexual

Seleção de machos sexualmente ativos: ratos machos adultos foram colocados em caixas de ambientação com fêmeas e foram mantidos durante quinze dias a fim de adquirirem experiência sexual. Após este período, os ratos permaneciam sozinhos por mais sete dias (período de abstinência sexual). Os animais foram então testados em seu desempenho sexual, que consistia em avaliar durante 10 minutos o comportamento do macho perante uma fêmea. As fêmeas eram submetidas à retirada dos ovários e a injeções intramusculares de benzoato de estradiol (2µg/rata), 48 horas antes do teste e progesterona (500 µg/rata), 6 horas antes do teste, para indução da receptividade sexual. Os machos que ao serem colocados com as fêmeas, apresentassem mais de 6 intromissões penianas no período de dez minutos eram considerados como sexualmente ativos e separados para serem submetidos ao experimento para verificação do comportamento sexual das fêmeas.

Fêmeas virgens (não submetidas a procedimentos anteriores) dos grupos analisados com idade aproximada de 90 dias e que estavam na fase do proestro eram colocadas em uma caixa de observação (70 X 70 X 35 cm) por 10 minutos para ambientação. O macho era colocado com a fêmea iniciando-se a sessão de registro durante o período escuro do ciclo (entre as 20:00 e 21:00 hs), por 15 minutos. O registro consistia na filmagem dos animais com uma filmadora e os parâmetros comportamentais analisados eram a frequência de lordose, que consiste no número de vezes que a fêmea eleva a parte traseira do dorso, expondo a genitália para o macho montar e a frequência de montas, que é o número de vezes que o macho usa as patas dianteiras para segurar a fêmea pelos flancos (figura 5). O quociente de lordose da receptividade sexual da fêmea foi calculado pela divisão do número de lordoses pelo número de montas (Sodersten & Hansen 1977).

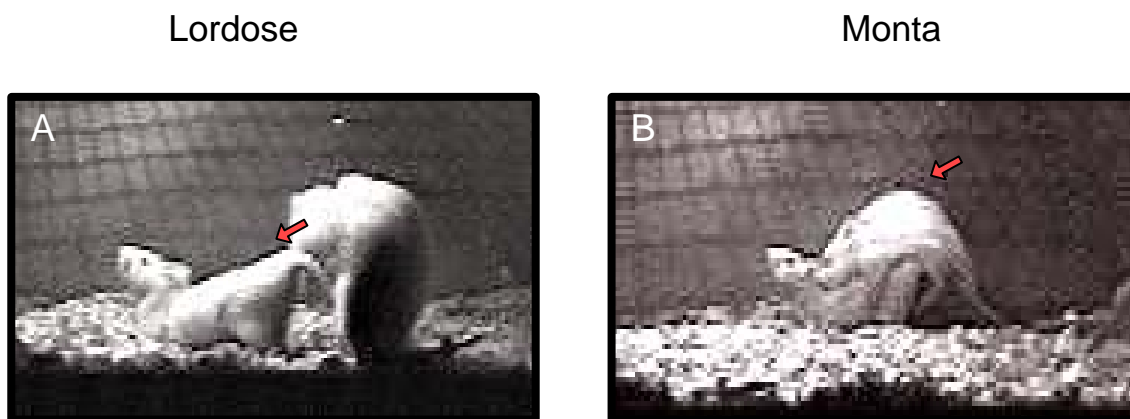


Figura 4 – Descrição visual dos comportamentos de lordose pela fêmea (A) e monta pelo macho (B) durante filmagem de comportamento sexual.

3.8. Coleta de sangue e dosagem dos hormônios reprodutivos

Na tarde do dia anterior ao proestro, as fêmeas (não submetidas a procedimentos anteriores) foram submetidas à canulação da veia jugular direita (figura 5). No momento do experimento, um tubo de polietileno (PE 50) era conectado ao cateter inserido na jugular, preenchido com salina heparinizada (200 I.U. heparina/ml) e as ratas permaneciam em caixas individuais em ambiente silencioso por 30

minutos até o início das coletas de sangue. Amostras de sangue (1 colheita a cada hora 0,6 ml) foram colhidas a cada hora (13:00 – 18:00 hs) na tarde do proestro em seringas descartáveis heparinizadas. Após cada retirada, 0,6 ml de 0,9% NaCl era injetado para repor o volume retirado. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm. O plasma era separado e estocado a -20°C para dosagem das concentrações de LH, estradiol, progesterona e prolactina.

As dosagens hormonais foram realizadas por radioimunoensaio. As concentrações de estradiol e progesterona foram determinadas utilizando-se *kits* específicos (Estradiol DSL – 4400 e Progesterona DSL – 3400, Diagnostics Systems Laboratories, Texas, USA). O limite mínimo para detecção foi 7.5 pg/ml, para o estradiol e 0.34 ng/ml para a progesterona. Os radioimunoensaios para LH e prolactina foram realizados usando kits específicos fornecidos pelo National Hormone and Peptide Program (Harbor-UCLA Medical Center, USA). Os anticorpos utilizados foram o anti-rato LH-S10 e prolactina-S9; os padrões foram LH-RP3 e PRL-RP3. O limite mínimo para a detecção foi 0.04 ng/ml para o LH e 0.19 ng/ml para a prolactina.

3.9. Contagem do número de oócitos

Na manhã do estro (09:00h), os ovários das fêmeas (não submetidas a procedimentos anteriores) foram removidos e os ovidutos foram dissecados e colocados entre 2 lâminas para observação em microscópio. O número de oócitos de ambos os ovidutos foram contados através de um microscópio óptico com uma lente de aumento de 2,5.

3.10. Teste intravenoso de tolerância à glicose (ivGTT)

Na tarde do dia anterior ao experimento, os animais (não submetidos a procedimentos anteriores) foram submetidos à canulação da veia jugular direita (figura 4) e, doze horas antes do experimento, o

alimento era retirado para que os animais permanecessem em jejum. No dia do experimento, as ratas permaneciam em caixas individuais em ambiente silencioso por 30 minutos até o início das coletas de sangue. As ratas permaneciam em caixas individuais para aclimação e em ambiente silencioso por 30 minutos até o início das coletas de sangue.

Solução de glicose a 50% era administrada em um volume correspondente a 1 g/kg de peso corporal, intravenosamente, através do cateter da jugular e amostras de sangue foram coletadas em seringas heparinizadas imediatamente antes (jejum) e 15' e 30' e 60 minutos após a injeção de glicose. O sangue era imediatamente centrifugado (3000 rpm por 15 minutos) após a coleta a 4°C, para obtenção do plasma, que era separado e congelado. As amostras de sangue para dosagem da glicemia foram coletadas em uma fita e dosadas com o auxílio de um glicosímetro (AccuChek Advantage, Roche Diagnostic, Suíça). A dosagem de insulina foi realizada através de radioimunoensaio.

Para análise da resistência à insulina, foi utilizado o HOMA (Modelo de Acesso Homeostático – Resistência à Insulina), através do cálculo:

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{glicemia de jejum (mM)} \times \text{Insulinemia de jejum (\mu\text{U/mL})}{22,5} \quad (\text{Santoro } et al. 2004)$$

3.11. Dosagem de triglicerídeos, colesterol total, HDL e LDL.

Doze horas antes do experimento, o alimento era retirado para que os animais (não submetidos a procedimentos anteriores) permanecessem em jejum. No dia do experimento, tubos de ensaio eram lavados com solução salina e conduzidos à estufa (37°/38°C) por 01 hora. Os animais eram pesados e decapitados e o sangue coletado do tronco cerebral em ambiente silencioso, em tubos e funis previamente heparinizados. As amostras de sangue eram centrifugadas a 3000 rpm, o plasma coletado e estocado a -20°C. As concentrações de colesterol total, HDL, LDL e de triglicerídeos foram dosadas por método espectrofotométrico.

3.12. Análises estatísticas

Todos os valores apresentados foram expressos como média \pm E.P.M. A significância das diferenças entre 2 grupos (controle e cafeteria) foi determinada utilizando-se o teste *t* de Student para amostras não-pareadas. A significância das diferenças de mais de 2 grupos e entre as amostras de sangue coletadas foram determinadas pelo teste de variância ANOVA de 2 vias, seguida pelo teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações. Em todos os casos, o nível de significância considerado foi $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Experimento 1: Efeito da dieta da cafeteria, introduzida a partir do desmame, sobre processos reprodutivos em ratas

A figura 5 representa os pesos das gorduras perigonadal (figura 5A, $P < 0.0001$) e retroperitoneal (figura 5B, $P = 0.0004$) aos 30 dias de vida no grupo tratado com a dieta da cafeteria, valores em média significativamente maiores que os valores obtidos no grupo tratado com ração padrão a partir do desmame. Este efeito de maior acúmulo de gordura do grupo CAF em relação ao grupo CTL se prolongou até a vida adulta (aproximadamente 100 dias de idade), quando as fêmeas do grupo CAF apresentaram maiores pesos das gorduras perigonadal (figura 6A, $P < 0.0001$) e retroperitoneal (figura 6B, $P < 0.0001$), valores em média maiores do que os valores obtidos nos pesos desses parâmetros nos respectivos controles.

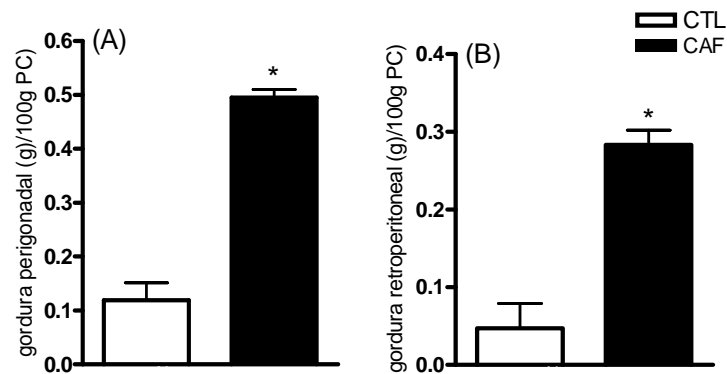


Figura 5. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria a partir do desmame sobre o peso das gorduras perigonadal (A) e retroperitoneal (B) (g / 100 g de peso corporal) de ratas Wistar aos 30 dias de vida. Resultados expressos como média \pm E.P.M. * diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle (CTL) e cafeteria (CAF).

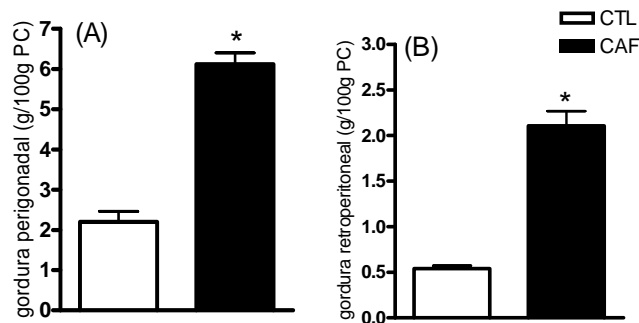


Figura 6. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria a partir do desmame sobre o peso das gorduras perigonadal (A) e retroperitoneal (B) (g / 100 g de peso corporal) de ratas Wistar adultas. Resultados expressos como média \pm E.P.M. *diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle (CTL) e cafeteria (CAF).

O gráfico 7 mostra as ingestões de alimentos e de calorias de fêmeas submetidas à dieta da cafeteria e de ração padrão a partir do desmame. Nos dois primeiros dias os animais do grupo CAF ingeriram maiores quantidades de alimentos em gramas do que os animais do grupo CTL, que se igualou à desses animais até 11º dia. Do 12º ao 45º dias, os animais do grupo CTL ingeriram mais alimento em gramas do que as fêmeas do grupo CAF. A partir do 52º dia até o final do experimento, o volume ingerido pelo grupo CAF se sobrepôs ao do grupo CTL. Apesar de, na maior parte do experimento, o controle da ingestão alimentar em peso ter revelado ser maior no grupo CTL, na análise da quantidade de energia ingerida durante o experimento, verificamos maior ingestão de energia pelo grupo cafeteria desde nos 3 primeiros dias do controle e após, do 8º até o 57º dias.

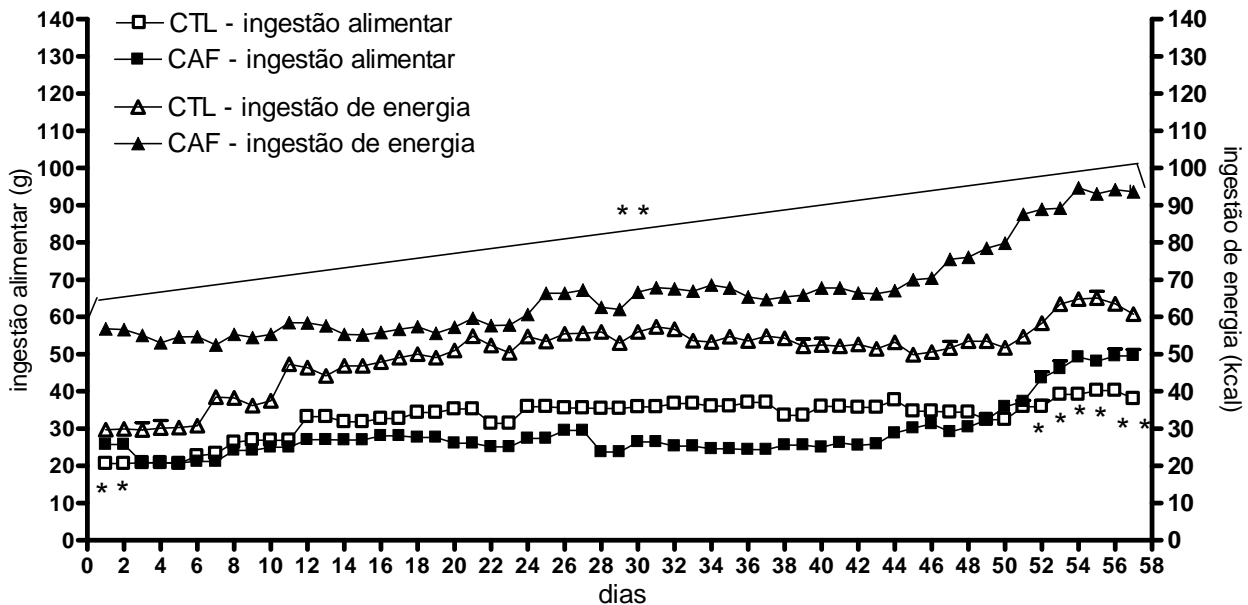


Figura 7. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria a partir do desmame sobre a ingestão alimentar (g) e sobre a ingestão de energia (Kcal) a cada dia de ratas Wistar. Resultados expressos como média \pm E.P.M. dos grupos controle (CTL) e cafeteria (CAF). * $P < 0.05$ para ingestão alimentar CAF versus CTL; ** $P < 0.05$ para ingestão de energia CAF versus CTL.

Na análise da evolução do peso corporal (figura 8), verificamos que as fêmeas do grupo CAF mantiveram menores pesos do que as do grupo CTL até próximo da metade do período avaliado, e, após, houve um aumento significativo da média do peso corporal das fêmeas do grupo CAF em relação ao grupo CTL.

No teste intravenoso de tolerância à glicose (ivGTT - figura 9), no dois grupos avaliados, a glicose aumentou significativamente aos 15 minutos em relação à glicose basal e aos 30 e 60 minutos, quando as suas concentrações sanguíneas foram reduzindo-se em ambos os grupos, alcançando valores basais nesses tempos no grupo CTL. No grupo CAF, por outro lado, após o aumento aos 15 minutos, as concentrações de glicose não retornaram aos valores semelhantes aos basais, sendo estatisticamente mais elevadas aos 30 minutos do que aos 60 minutos.

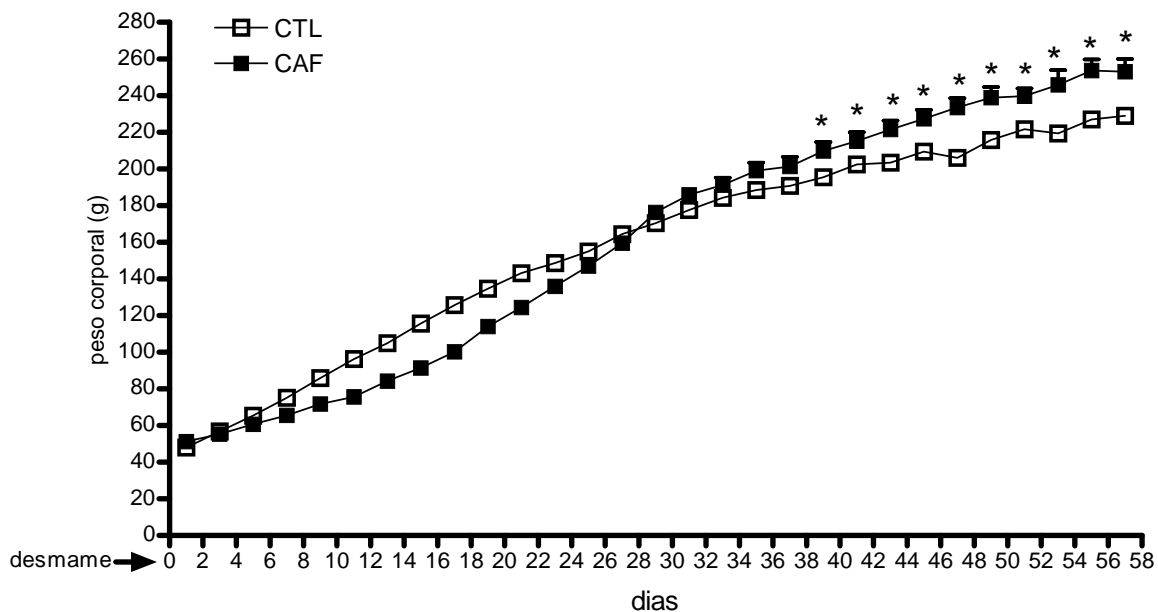


Figura 8. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria a partir do desmame sobre a evolução do peso corporal (g) a cada dois dias de ratas Wistar. Resultados expressos como média \pm E.P.M. dos grupos controle (CTL) e cafeteria (CAF). * $P < 0.05$ CAF *versus* CTL.

A glicose de jejum do grupo CAF não diferiu da glicose de jejum do grupo CTL (figura 9A, $P = 0.489$). No entanto, as concentrações sanguíneas de glicose do grupo CAF estavam mais elevadas aos 15, 30 e 60 minutos em relação às respectivas concentrações do grupo CTL. A área sobre a curva da glicose (AUC) foi maior no grupo CAF quando comparada ao grupo CTL (figura 9B, $P < 0.0001$). Foi observado um efeito significativo para *grupo* ($F = 60.79$, $P < 0.0001$) e para *hora do dia* ($F = 321.5$, $P < 0.0001$), no entanto, nenhum efeito significativo para a interação entre *grupo* e *hora do dia* ($F = 19.48$, $P < 0.0001$) foi detectado.

Tanto as concentrações basais de insulina do grupo CAF (figura 9C) quanto as concentrações de insulina aos 15, 30 e 60 minutos após a injeção de glicose, apresentavam-se elevadas em relação às respectivas concentrações do grupo CTL. Similarmente às concentrações de glicose, a insulina plasmática também apresentou uma elevação aos 15 minutos em relação à insulina basal e aos 30 e 60 minutos e posteriormente, uma redução tempo-dependente foi observada nas concentrações de glicose em ambos os grupos.

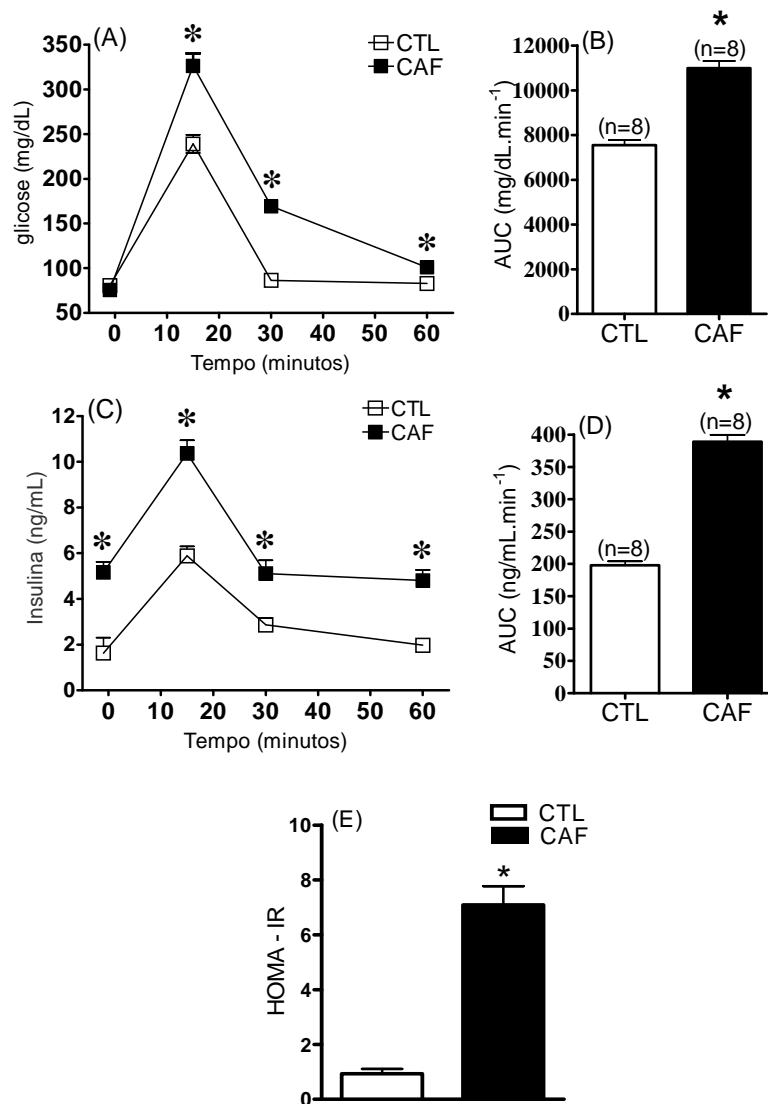


Figura 9. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria a partir do desmame sobre as concentrações sanguíneas (A) e AUC (B) de glicose (mg/dL) e concentrações plasmáticas (C) e AUC (D) de insulina (ng/mL) de ratos Wistar adultos 1 minutos antes e 15 minutos, 30 minutos e 60 minutos após a administração *iv* de glicose (1,5 g / kg peso corporal). HOMA-IR representado na figura 9E. Resultados expressos como média \pm EPM. *diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle (CTL) e cafeteria (CAF).

As concentrações de insulina foram reduzindo-se até valores semelhantes aos basais tanto aos 30 quanto aos 60 minutos, não diferindo também entre si nesses dois tempos. Foi observado um efeito significativo para *grupo* ($F = 82.13, P < 0.001$) e *hora do dia* ($F = 39.94, P < 0.001$). Nenhuma interação entre *grupo* e *hora do dia* ($F = 1.78, P = 0.16$) foi detectada. O AUC da insulina (figura 9D) foi maior no grupo CAF do que no grupo CTL ($P < 0.0001$); a análise do HOMA (*Homeostasis Method Assesment* - figura 9E) evidenciou uma diferença significativa entre os dois grupos ($P < 0.0001$), revelando uma resistência à insulina nos animais do grupo CAF em relação aos animais do grupo CTL.

As concentrações de triglicerídeos (A), colesterol total (B), HDL (C) e LDL (C) dos grupos CTL e CAF estão representadas na figura 10. O grupo CAF apresentou elevações nas concentrações de triglicerídeos ($P = 0.005$) e de colesterol LDL ($P < 0.0001$) e redução de HDL ($P = 0.013$) em relação ao grupo CTL, mas não diferiu significativamente nas concentrações de colesterol total ($P = 0.209$).

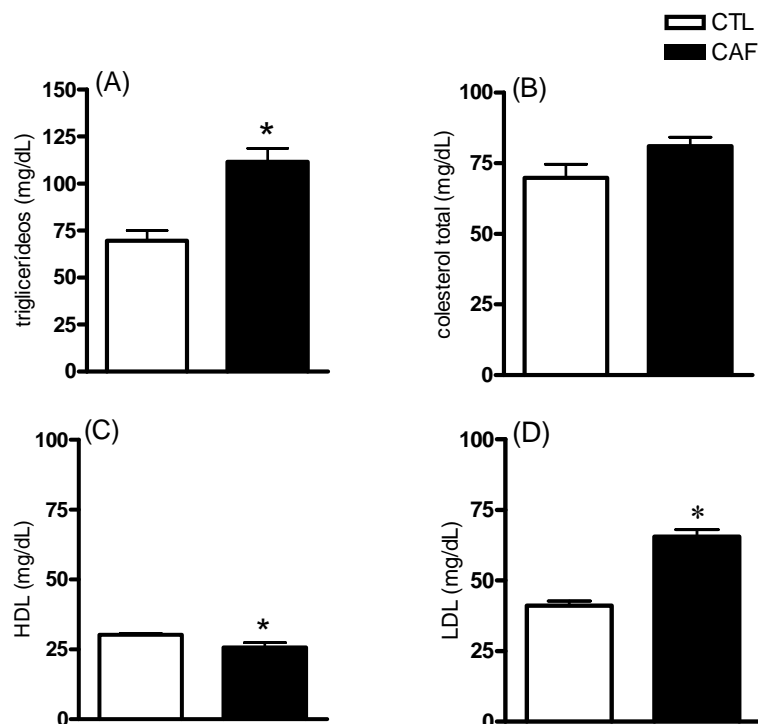


Figura 10. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria a partir do desmame sobre as concentrações plasmáticas de triglicerídeos (A), colesterol total (B), lipoproteína de alta densidade (HDL - (C)) e lipoproteína de baixa densidade (LDL - (D)) (média \pm erro padrão da média - mg/dL) de ratas Wistar adultas. *diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle (CTL) e cafeteria (CAF).

A dieta da cafeteria promoveu uma antecipação da abertura vaginal das ratas (figura 11, $P = 0.005$); o grupo CAF apresentou uma instalação da puberdade precoce quando comparada às fêmeas do grupo CTL. Além disso, a frequência média de ocorrência da fase de diestro foi significativamente maior nas fêmeas do grupo CAF (15.33 ± 0.41 , $P < 0.05$) do que das fêmeas do grupo CTL (10.80 ± 0.42). Entretanto, a frequência das fases de metaestro (5.00 ± 0.34 , $P = 0.880$), proestro (4.50 ± 0.27 , $P = 0.091$) e estro (6.78 ± 0.39 , $P = 0.056$) das fêmeas do grupo CAF não difeririam da frequência de metaestro (5.07 ± 0.25), proestro (5.20 ± 0.29) e estro (7.80 ± 0.31) das fêmeas do grupo CTL. Os pesos do útero ($P = 0.122$) e dos ovários ($P = 0.143$) não foram afetados pela dieta da cafeteria (CTL *versus* CAF).

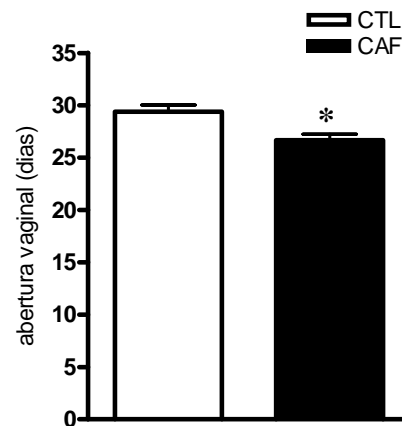


Figura 11. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria a partir do desmame sobre a data da abertura vaginal (média \pm erro padrão da média) de ratas Wistar, *diferenças estatisticamente significativas; teste *T* de Student ($t = 3.171$, $P = 0.048$).

A figura 12 mostra o efeito da dieta da cafeteria sobre o comportamento sexual das fêmeas. A relação número de lordoses / número de montas não foi significativamente diferente entre as fêmeas do grupo CTL (0.93 ± 0.02) quando comparada ao grupo CAF (0.90 ± 0.03 , $P = 0.186$).

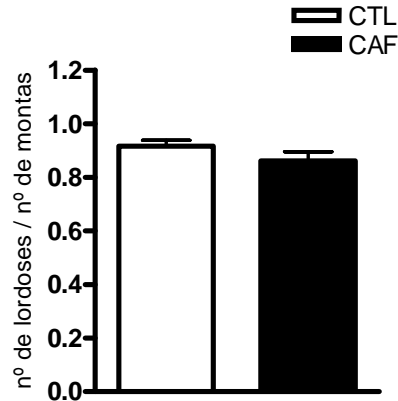


Figura 12. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria a partir do desmame sobre a receptividade sexual (número de lordoses / número de montas - média \pm E.P.M.) de ratas Wistar adultas dos grupos controle (CTL) e cafeteria (CAF).

Quando comparamos o número de óvulos liberados pelas fêmeas (figura 13), observamos uma redução na média do número de óvulos (3.0 ± 1.32) liberados pelas fêmeas do grupo CAF quando comparados à média do número de óvulos liberados pelas fêmeas do grupo CTL (10.17 ± 0.78 , $p < 0.0001$).

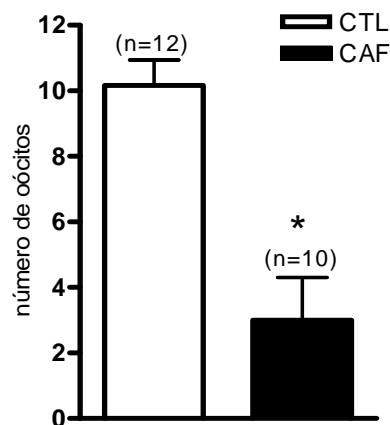


Figura 13. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria a partir do desmame sobre o número de oócitos de ratas Wistar adultas. Média \pm E.P.M. *diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle (CTL) e cafeteria (CAF).

A figura 14 mostra as concentrações plasmáticas de estradiol (A), progesterona (B), LH (C) e prolactina a cada hora, das 13 às 18 horas do dia na fase do proestro. Elevações significativas nas concentrações de estradiol às 1500 h dos grupos CTL + SAL e CTL + LOS foram observadas, quando

comparadas com as outras horas avaliadas em ambos os grupos, que não diferiram entre si em outros horários avaliados. Além desta elevação às 1400 h, no grupo CAF, às 1600h e 1800 h também foram observados aumentos significativos quando comparados com as concentrações das 1300, 1500 e 1700h, originando um padrão de aumento e redução na secreção de estradiol. A análise da AUC (figura 15B, $P = 0.921$) não evidenciou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Nenhum efeito significativo para *grupo* ($F = 0.05$, $P = 0.83$) e para *hora do dia* ($F = 1.28$, $P = 0.28$) ou para interação entre *grupo* e *hora do dia* ($F = 0.56$, $P = 0.72$) foi detectado.

As concentrações plasmáticas de progesterona do grupo CTL alcançaram os valores mais elevados às 1500 h comparados com os outros horários avaliados, e a todos os horários avaliados do grupo CAF. Após o pico às 1500 h, as fêmeas do grupo CTL apresentaram reduções gradativas e estatisticamente significativas das concentrações de progesterona às 1600, 1700 e 1800 h. Nenhuma elevação nas concentrações de progesterona foi observada no grupo CAF, permanecendo similares em todos os horários analisados. A análise da AUC (figura 16B, $P < 0.0001$) evidenciou uma redução estatisticamente significativa no grupo CAF comparada com o grupo CTL. Efeitos significativos para *grupo* ($F = 10.35$, $P = 0,002$) e *hora do dia* ($F = 2.87$, $P = 0,019$), bem como significativa interação entre *grupo* e *hora do dia* ($F = 2.50$, $P = 0,037$) foram detectados.

As concentrações plasmáticas de LH do grupo CTL alcançaram os valores mais elevados às 1700 h comparadas às outras horas avaliadas e ao LH plasmático às 1700 h e dos demais horários avaliados do grupo CAF. Não foi verificado pico de LH do grupo CAF na tarde do proestro, no entanto, as suas concentrações foram significativamente maiores as 1700 e 1800 h comparadas às 1300, 1400 e 1600 h, mas não diferiram das suas concentrações às 1500 h e entre si. A análise da AUC (figura 17B, $P < 0.0001$) evidenciou uma redução no grupo CAF comparada com o grupo CTL. Efeitos significativos para *grupo* ($F = 5.33$, $P = 0.038$) e *hora do dia* ($F = 29.44$, $P < 0.0001$) e significativa interação entre *grupo* e *hora do dia* ($F = 17.40$, $P < 0.0001$) foram detectados.

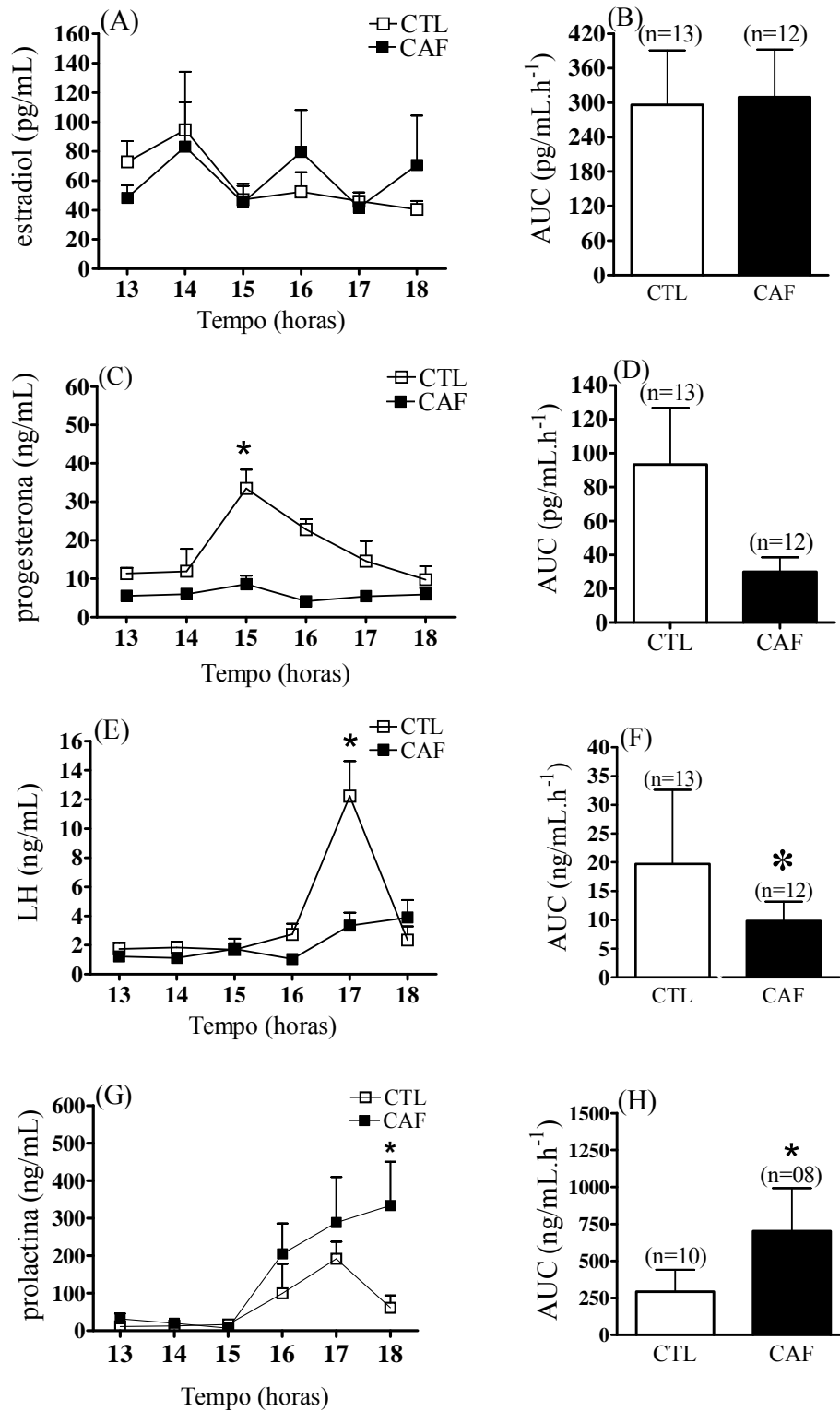


Figura 14. Efeito da dieta da cafeteria a partir do desmame sobre as concentrações plasmáticas de estradiol ((A) pg/mL), e AUC de estradiol (B), de progesterona ((C) ng/mL) e AUC de progesterona (D), de LH ((E) ng/mL) e AUC de LH (F) e de prolactina ((G) ng/mL) e AUC de prolactina (H) na tarde do proestro de ratas Wistar adultas. As amostras de sangue foram colhidas às 13, 14, 15, 16, 17 e 18 horas. Média \pm E.P.M. dos grupos controle (CTL) e cafeteria (CAF). *diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle (CTL) e cafeteria (CAF).

As concentrações de prolactina permaneceram semelhantes entre os grupos e entre os horários até as 1500 h. Posteriormente elevações gradativas e estatisticamente significativas foram observadas a partir das 1600 h até as 1700 h no grupo controle e que, no grupo CAF, continuaram a elevar-se até as 1800 h, originando as diferenças significativas observadas nas concentrações de prolactina nesse horário entre os grupos. Efeitos significativos para *grupo* ($F = 5.86, P = 0.018$) e *hora do dia* ($F = 4.06, P = 0.003$) foram detectados. Nenhuma interação entre *grupo* e *hora do dia* foi detectada ($F = 1.39, P = 0.239$). A análise da AUC ($P = 0.209$) não evidenciou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

4.2. Experimento 2: Efeito da associação da administração de losartan com a dieta da cafeteria, introduzidos a partir do desmame, sobre processos reprodutivos em ratas

Os pesos das gorduras perigonadal (A) e retroperitoneal (B) de fêmeas são mostrados nas figuras 15 (30 dias de idade) e 16 (idade adulta). Aumentos nos pesos de ambas as gorduras foram constatados no grupo CAF + SAL comparados aos seus respectivos pesos no grupo CTL + SAL em fêmeas aos 30 dias de idade e adultas. A injeção do antagonista losartan a partir do desmame não alterou os pesos das gorduras analisadas no grupo CTL em nenhuma das idades (CTL + SAL *versus* CTL + LOS), no entanto, promoveu redução no peso das gorduras no grupo CAF + LOS em relação ao grupo CAF + SAL da gordura perigonadal e da gordura retroperitoneal nas fêmeas aos 30 dias de idade, e das gorduras perigonadal e retroperitoneal nas fêmeas adultas. Apesar dos pesos das duas gorduras analisadas no grupo CAF + LOS serem menores quando comparados ao grupo CAF + SAL, aos 30 dias de idade, ainda se mantiveram maiores do que os pesos das gorduras nos grupos CTL + SAL e CTL + LOS. Nas fêmeas adultas, os pesos das gorduras perigonadal e retroperitoneal do grupo CAF + LOS foram reduzidos até se tornarem iguais aos seus pesos nos grupos CTL + SAL e CTL + LOS.

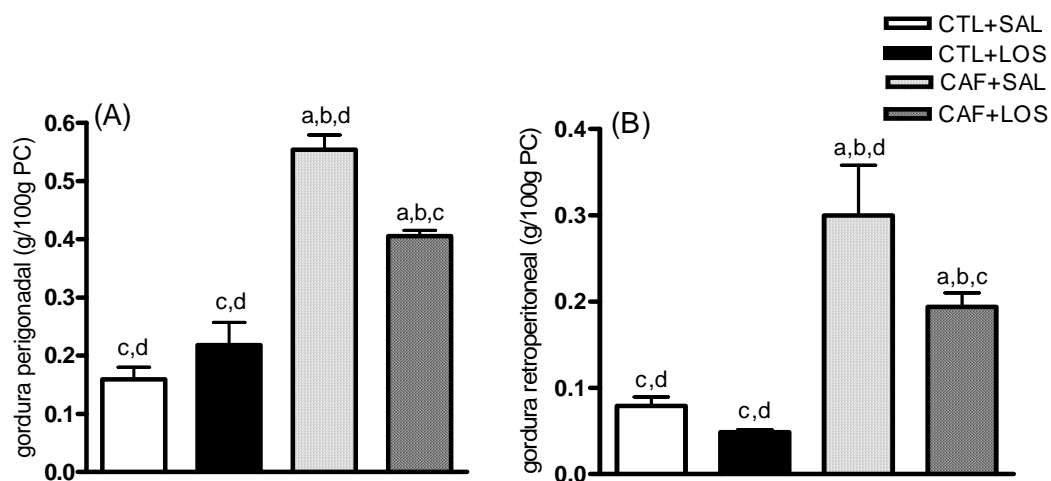


Figura 15. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria e da injeção de losartan a partir do desmame sobre o peso das gorduras perigonadal (A) e retroperitoneal (B) (g / 100 g de peso corporal) de ratas Wistar aos 30 dias de idade. Resultados expressos como média \pm E.P.M. As letras sobre as colunas representam diferenças estatísticas, resultando nos seguintes grupos: (a) controle + salina (CTL + SAL), (b) controle + losartan (CTL + LOS), (c) cafeteria + salina (CAF + SAL) e (d) cafeteria + losartan (CAF + LOS).

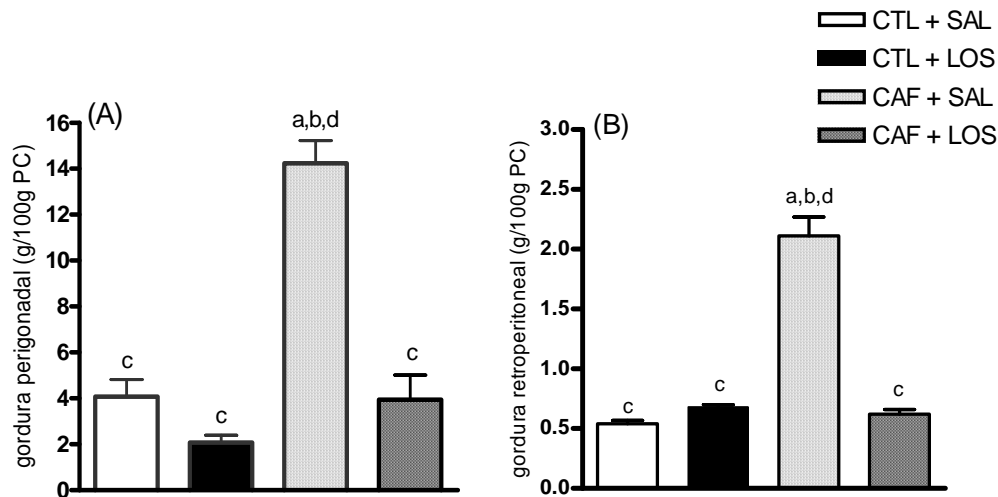


Figura 16. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria e da injeção de losartan a partir do desmame sobre o peso das gorduras perigonadal (A) e retroperitoneal (B) (g / 100 g de peso corporal) de ratas Wistar adultas. Resultados expressos como média \pm E.P.M. As letras sobre as colunas representam diferenças estatísticas, resultando nos seguintes grupos: (a) controle + salina (CTL + SAL), (b) controle + losartan (CTL + LOS), (c) cafeteria + salina (CAF + SAL) e (d) cafeteria + losartan (CAF + LOS).

A figura 17 mostra as ingestões de alimentos e de energia de fêmeas submetidas às dietas de cafeteria e de ração, e à injeção de salina ou de losartan. O grupo CAF + SAL apresentou maior ingestão nos dois primeiros dias de dieta e menores ingestões de alimento em gramas na maior parte do experimento (até os 55º dia) do que o grupo CTL + SAL, aumentando a ingestão alimentar se comparada a esse grupo nos dias 56 e 57. A quantidade de energia ingerida calculada foi maior no grupo CAF + SAL quando comparada ao grupo CTL + SAL durante todo o período avaliado. O losartan, por sua vez, não alterou nem a ingestão alimentar em gramas e nem a quantidade de energia ingerida entre os grupos CTL (CTL + SAL *versus* CTL + LOS). Nas fêmeas do grupo CAF (CAF + LOS *versus* CAF + SAL), até o 26º dia não promoveu diferença entre os grupos, no entanto, do 31º dia até o final do controle de ingestão alimentar, induziu aumento significativo na quantidade de alimento ingerido pelo grupo CAF + LOS, o que originou uma maior quantidade de energia ingerida por esse grupo, quando comparado com o grupo CAF + SAL.

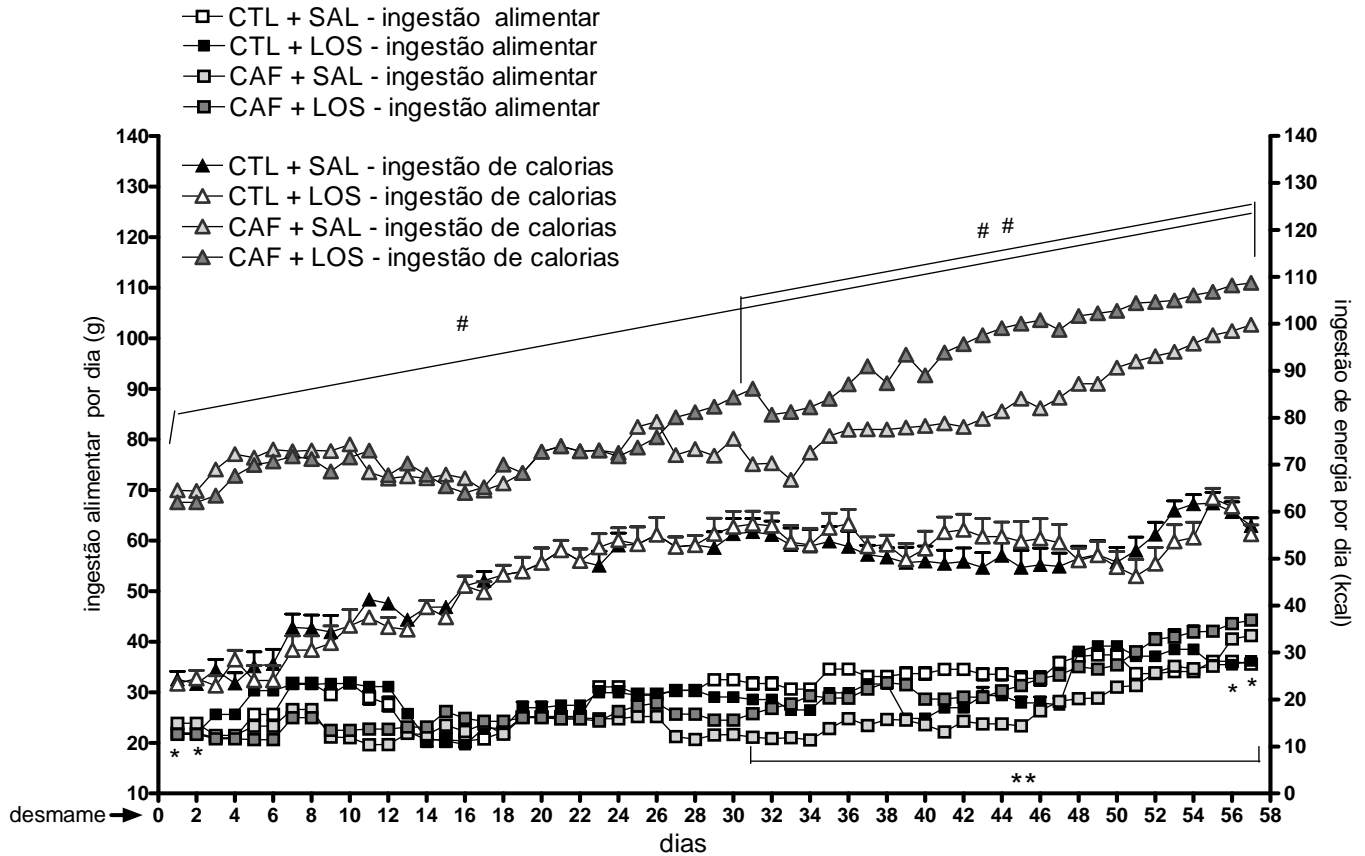


Figura 17. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria e da injeção de losartan a partir do desmame sobre a ingestão alimentar (g) e sobre a ingestão de energia (Kcal) a cada dia de ratas Wistar. Resultados expressos como média \pm E.P.M. dos grupos controle + salina (CTL + SAL), controle + losartan (CTL + LOS), cafeteria + salina (CAF + SAL) e cafeteria + losartan (CAF + LOS). * $P < 0.05$ para ingestão alimentar de CAF + SAL versus CTL + SAL; **, $P < 0.05$ para ingestão alimentar de CAF + LOS versus CAF + SAL. # $P < 0.05$ para ingestão de calorias de CAF + SAL versus CTL + SAL; ##, $P < 0.05$ para ingestão de calorias de CAF + LOS versus CAF + SAL.

A evolução do peso corporal (representado na figura 18) foi menor na maior parte dos dias de controle no grupo CAF + SAL comparado ao grupo CTL + SAL, e nos últimos 5 dias, um aumento foi verificado no grupo CAF + SAL em relação ao grupo CTL + SAL. As fêmeas do grupo CAF + LOS apresentaram médias de peso corporal semelhantes aos dos grupos controle e apresentam peso corporal maior na primeira metade do experimento e menor na segunda metade do controle do que o grupo CAF + SAL, assim como verificado para os grupos controle, evidenciando um efeito de redução de evolução de peso corporal induzido pelo losartan.

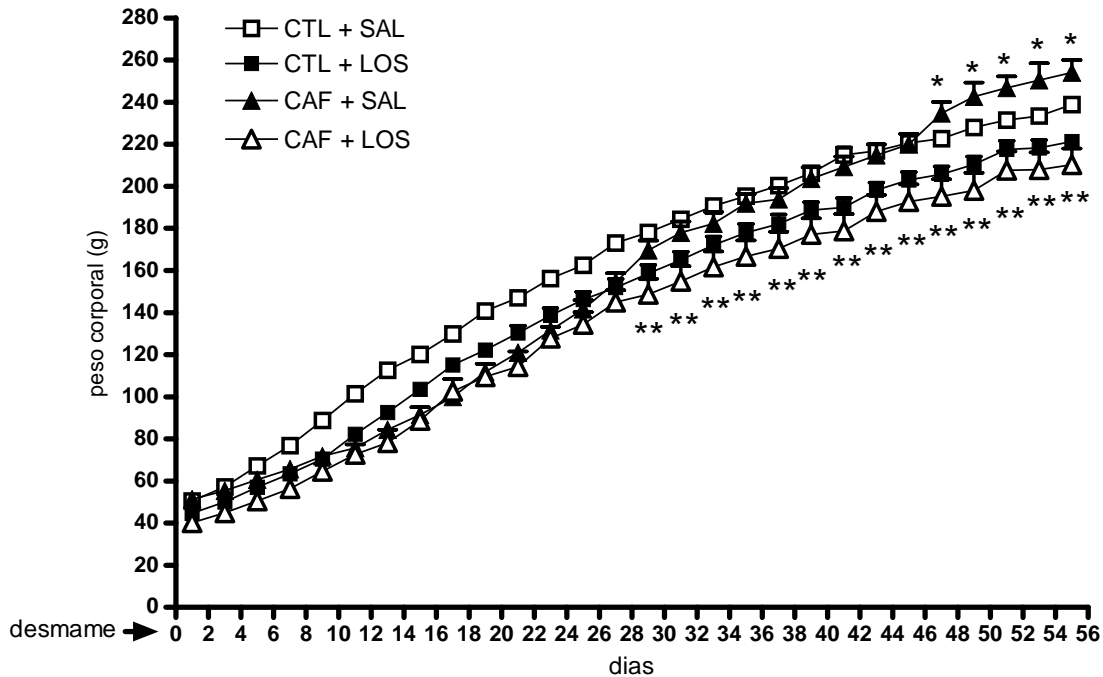


Figura 18. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria e da injeção de losartan a partir do desmame sobre a evolução do peso corporal (g) a cada dois dias de ratos Wistar. Resultados expressos como média \pm E.P.M. dos grupos controle + salina (CTL + SAL), controle + losartan (CTL + LOS), cafeteria + salina (CAF + SAL) e cafeteria + losartan (CAF + LOS). * $P < 0.05$ para CAF + SAL *versus* CTL + SAL; **, $P < 0.05$ para CAF + LOS *versus* CAF + SAL.

A figura 19 mostra as concentrações de glicose (A e B) e insulina (C e D) de jejum e 15, 30 e 60 minutos após a administração intravenosa de glicose 50%, bem como o HOMA-IR (E e F) de fêmeas submetidas à dieta da cafeteria e à injeção de losartan. O bloqueio dos receptores AT_1 de Angiotensina II não alterou as concentrações de glicose de jejum, que não diferiram entre todos os grupos avaliados. As concentrações de glicose do grupo CTL + SAL não diferiram do grupo CTL + LOS nos tempos analisados. Aos 15 minutos após a injeção *iv* de glicose, as concentrações de glicose no grupo CAF + LOS comparado com o grupo CAF + SAL reduziram, alcançando valores similares aos do grupo CTL + LOS, porém ambos diferindo do grupo CTL + SAL. Esta diferença foi abolida aos 30 minutos, onde verificamos que em todos os grupos, as concentrações de glicose foram reduzindo, alcançando valores iguais aos dos grupos CTL + SAL no grupo CAF + LOS e permanecendo significativamente diferentes dos outros grupos no grupo CAF + SAL, até os 60 minutos após a injeção de glicose. Foi observado um

efeito significativo para *grupo* ($F = 6.35$, $P < 0.0001$), *hora do dia* ($F = 811.4$, $P < 0.0001$) e para a interação entre *grupo* e *hora do dia* ($F = 16.98$, $P < 0.0001$) foram detectados.

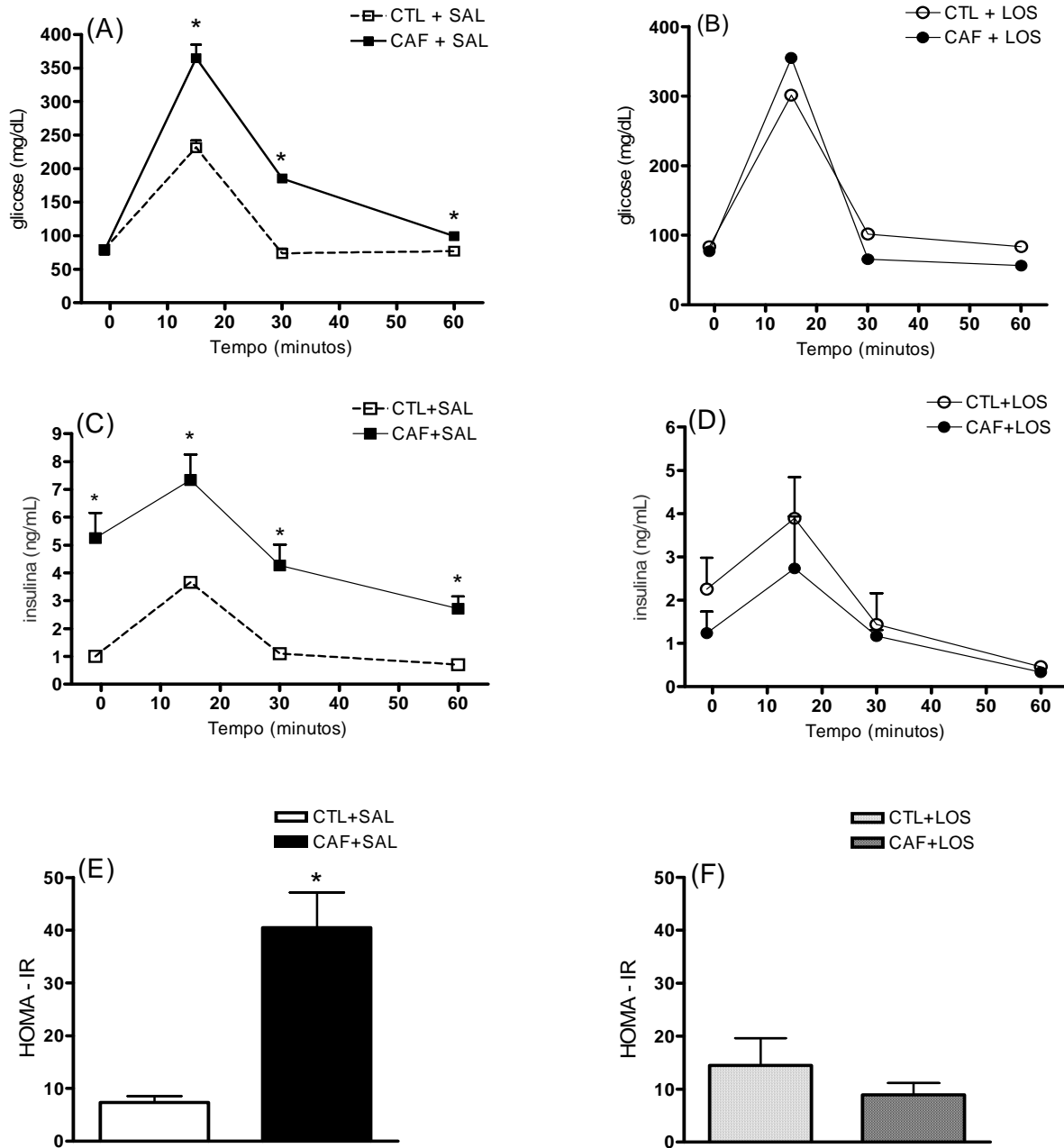


Figura 19. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria e da injeção de losartan a partir do desmame sobre as concentrações sanguíneas de glicose (média \pm erro padrão da média - mg/dL) e sobre as concentrações plasmáticas de insulina (média \pm erro padrão da média - ng/ml) de ratas Wistar adultas 1 minutos antes (A – tempo 0), 15 minutos (B – tempo 15), 30 minutos (C – tempo 30) e 60 minutos (D – tempo 60) após a administração *iv* de glicose (1,5 g / kg peso corporal). HOMA – IR representado nas figuras 23E.e 23F. Resultados expressos como média \pm EPM. * Representam diferenças estatísticas entre os grupos.

As concentrações de jejum de insulina, que estavam elevadas pelo efeito da ingestão da dieta da cafeteria (CAF + SAL *versus* CTL + SAL), se tornaram similares às concentrações do grupo CTL + LOS, mas diferindo do grupo CTL + SAL. O bloqueio dos receptores AT₁ normalizou as concentrações de jejum de insulina no grupo cafeteria (CAF + LOS *versus* CAF + SAL). No tempo 15, as concentrações de insulina se tornaram elevadas em todos os grupos, porém sendo significativamente maiores no grupo CAF + SAL e iguais nos grupos CAF + LOS, CTL + SAL e CTL + LOS, demonstrando efeito de redução do losartan sobre as concentrações de insulina no grupo CAF e de ausência de efeito no grupo CTL. Os mesmos efeitos foram observados nos tempos 30 e 60, quando as concentrações de insulina continuaram a reduzir em todos os grupos; no entanto, no tempo 30 a insulina do grupo CAF + LOS além de ser similar aos grupos CTL + SAL e CTL + LOS, também foi igual ao grupo CAF + SAL. Efeitos significativos para *grupo* ($F = 17.55, P < 0.0001$) e *hora do dia* ($F = 9.56, P < 0.0001$) foram detectados. Nenhuma interação entre *grupo* e *hora do dia* foi detectada ($F = 0.37, P = 0.94$). A análise do HOMA evidenciou ausência de efeito do bloqueio dos receptores AT₁ sobre a insulina no grupo CTL, no entanto, promoveu redução no grupo CAF ($P < 0.001$ - CAF + LOS *versus* CAF + SAL), e se igualou ao HOMA dos grupos CTL + LOS e CTL + SAL.

Assim como nos grupo CAF em relação ao grupo CTL (figura 10), na figura 20, podemos verificar uma elevação nas concentrações de triglicerídeos (A) e de colesterol LDL (D), bem como redução nas concentrações de colesterol HDL (C) e ausência de diferenças no colesterol total (B) no grupo CAF + SAL quando comparadas ao grupo CTL + SAL. A injeção de losartan promoveu redução nas concentrações de triglicerídeos e LDL do grupo CAF, que se tornaram iguais às do grupo CTL + SAL e CTL + LOS. As concentrações de HDL do grupo CAF + LOS foram similares às dos grupos controles e significativamente maiores que às do grupo CAF + SAL. O losartan não alterou as concentrações totais de colesterol no grupo CAF e de nenhum dos fatores avaliados no grupo CTL.

O efeito de antecipação da abertura vaginal das ratas da dieta da cafeteria isolada (figura 21) também foi verificado no grupo CAF + SAL quando comparada ao grupo CTL + SAL ($P = 0.007$), assim

como mostrado na figura 11 na comparação da data da instalação da puberdade entre os grupos CTL e CAF. Não houve diferença significativa entre a data da abertura vaginal do grupo CAF + LOS e do grupo CAF + SAL ($P = 0.005$). No entanto, o grupo CAF + LOS apresentou igualdade estatística ($P = 0.379$) com o grupo CTL + SAL, que não diferiu do grupo CTL + LOS ($P = 0.099$). Da mesma forma, os pesos do útero nos grupos controles (CTL + SAL *versus* CTL + LOS; $P = 0.597$) e cafeteria (CAF + SAL *versus* CAF + LOS; $P = 0.176$), assim como dos ovários nos grupos controles (CTL + SAL *versus* CTL + LOS; $P = 0.384$) e cafeteria (CAF + SAL *versus* CAF + LOS; $P = 0.218$) não foram alterados pela administração de losartan.

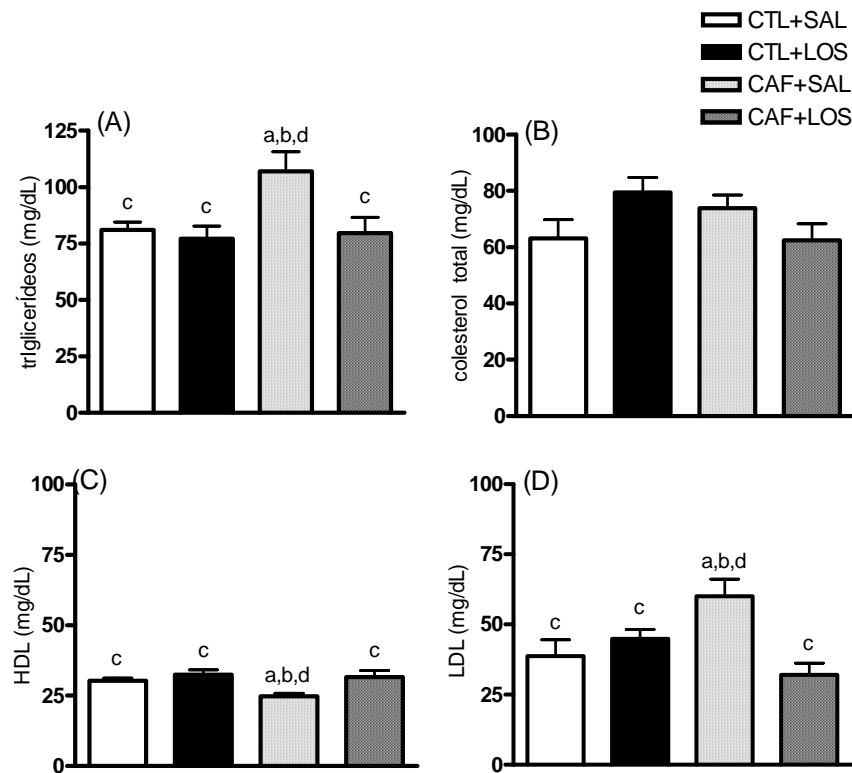


Figura 20. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria e da injeção de losartan a partir do desmame sobre as concentrações plasmáticas de triglicéridos (A), colesterol total (B), lipoproteína de alta densidade (HDL - (C)) e lipoproteína de baixa densidade (LDL - (D)) (média \pm erro padrão da média - mg/dL) de ratas Wistar adultas. As letras sobre as colunas representam diferenças estatísticas, resultando nos seguintes grupos: (a) controle + salina (CTL + SAL), (b) controle + losartan (CTL + LOS), (c) cafeteria + salina (CAF + SAL) e (d) cafeteria + losartan (CAF + LOS).

O bloqueio dos receptores de Angiotensina II não alterou a frequência média das fases de estro ($6,43 \pm 0,92$), proestro ($4,4 \pm 0,70$) e metaestro ($4,00 \pm 0,53$) do grupo CAF+LOS em relação à frequência de estro ($6,83 \pm 1,05$), proestro ($5,00 \pm 0,26$) e metaestro ($4,67 \pm 0,56$) do grupo CAF+SAL; do estro ($9,4 \pm 0,51$), proestro ($4,4 \pm 0,25$) e metaestro ($6,2 \pm 0,74$) do grupo CTL + SAL, e do estro ($7,29 \pm 1,7$), proestro ($5,29 \pm 0,61$) e metaestro ($5,86 \pm 0,26$) do grupo CTL + LOS. A dieta da cafeteria aumentou a frequência do diestro no grupo cafeteria (CAF+SAL *versus* CTL + SAL e CTL + LOS). A injeção de losartan no grupo CAF prolongou ainda mais a fase de diestro ($19,14 \pm 0,94$), diferindo do diestro do grupo CAF + SAL ($15,50 \pm 0,85$, $P < 0,05$), CTL + SAL ($10 \pm 0,55$, $P < 0,001$) e CTL + LOS ($11,43 \pm 0,78$, $P < 0,001$). Os grupos controle não diferiram entre si em todas as fases analisadas.

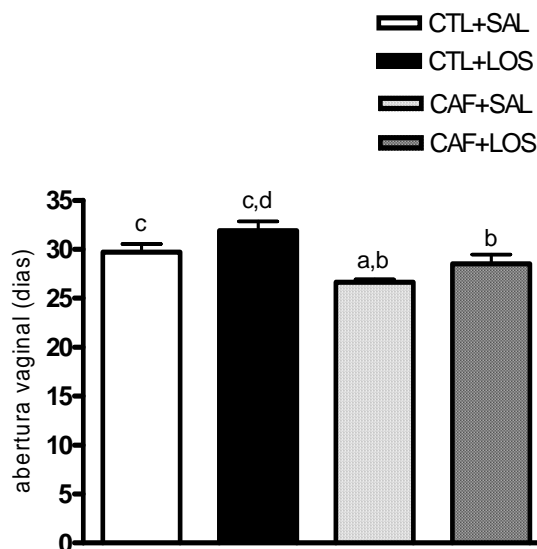


Figura 21. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria e da injeção de losartan a partir do desmame sobre a abertura vaginal (média \pm E.P.M.) de ratas Wistar. As letras sobre as colunas representam diferenças estatísticas, resultando nos seguintes grupos: (a) controle + salina (CTL + SAL), (b) controle + losartan (CTL + LOS), (c) cafeteria + salina (CAF + SAL) e (d) cafeteria + losartan (CAF + LOS).

A ausência de efeito da dieta da cafeteria sobre o comportamento sexual das fêmeas, como verificado anteriormente (CAF *versus* CTL - figura 12), também foi constatada entre os grupos CAF + SAL e CTL + SAL (figura 22, $P = 0,693$). Adicionalmente, a relação número de lordoses / número de

montas não foi alterada pela injeção do antagonista losartan de Angiotensina II nos grupos CTL ($P = 0.899$) e CAF ($P = 0.678$).

Interessantemente, a redução da ovulação induzida pela dieta da cafeteria (CTL *versus* CAF – figura 23) também verificada entre os grupos CTL + SAL *versus* CAF + SAL (figura X – $P < 0.0001$) foi revertida pela administração de losartan (CAF + SAL *versus* CAF + LOS – $P < 0.0001$). As fêmeas do grupo CAF + LOS apresentaram valores médios de ovulação semelhantes aos dos grupos CTL + SAL ($P = 0.059$) e CTL + LOS ($P = 0.174$). O bloqueio dos receptores de Angiotensina II não alterou o número de óvulos liberados pelos animais do grupo CTL (CTL + SAL *versus* CTL + LOS, $P = 0.539$).

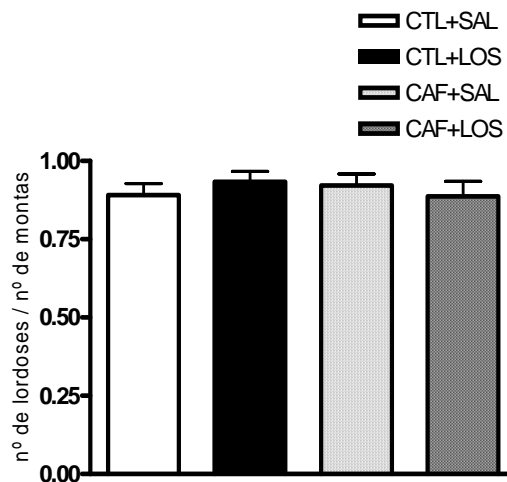


Figura 22. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria e da injeção de losartan a partir do desmame sobre a receptividade sexual (número de lordoses / número de montas - média ± E.P.M.) de ratas Wistar adultas dos grupos controle + salina (CTL + SAL), controle + losartan (CTL = LOS), cafeteria + salina (CAF + SAL) e cafeteria + losartan (CAF + LOS).

A figura 24 mostra as concentrações plasmáticas a cada hora, das 13 às 18 horas do dia na fase do proestro e a figura 25 as AUCs das concentrações de estradiol (A e B), progesterona (C e D), LH (E e F) e prolactina (G e H). Elevação nas concentrações de estradiol às 1500 h nos grupos CTL + SAL e CTL + LOS, as 1400 e 1700 h no grupo CAF + SAL e às 1600 h no grupo CAF + LOS, que não diferiram aos outros horários avaliados no mesmo grupo ou entre grupos.

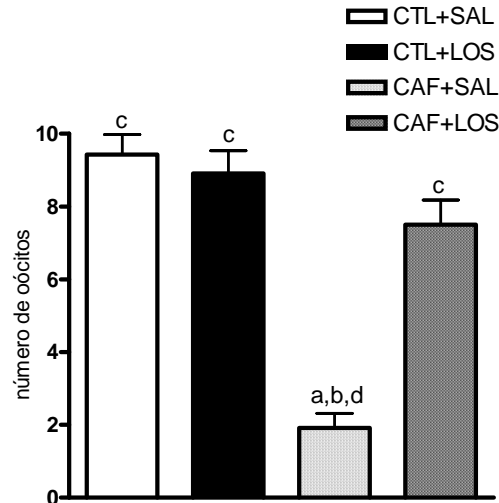


Figura 23. Efeito da ingestão da dieta da cafeteria e da injeção de losartan a partir do desmame sobre o número de oócitos de ratas Wistar adultas. Média \pm E.P.M. As letras sobre as colunas representam diferenças estatísticas, resultando nos seguintes grupos: (a) controle + salina (CTL + SAL), (b) controle + losartan (CTL + LOS), (c) cafeteria + salina (CAF + SAL) e (d) cafeteria + losartan (CAF + LOS).

A análise da AUC das concentrações de estradiol não evidenciou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Nenhum efeito significativo para *grupo* ($F = 0.713$, $P = 0.545$) e para interação entre *grupo* e *hora do dia* ($F = 1.115$, $P = 0.344$) foram detectados. No entanto, efeito significativo para tempo ($F = 2.868$, $P = 0.016$) foi detectado.

As concentrações plasmáticas de progesterona do grupo CTL + SAL alcançaram os valores mais significativamente elevados às 1500 h comparados com as concentrações às 1300, 1700 e 1800 h, não diferindo das 1400 e 1600 h. O grupo CTL + SAL apresentou também uma elevação às 1500 h, porém não diferente dos demais horários. A comparação entre todos os horários avaliados no grupo CAF + SAL não evidenciou diferença significativa e, no grupo CAF + LOS, um aumento nas concentrações de progesterona foi verificado às 1700 h, que diferiu de todos os outros horários nesse grupo.

A análise da AUC das concentrações de progesterona ($P < 0.0001$) evidenciou ausência de diferença significativa entre os grupos. Efeito significativo para *grupo* ($F = 8.903$, $P < 0.0001$) foi detectado. Nenhum efeito significativo para *hora do dia* ($F = 1.987$, $P = 0,081$) e para interação entre *grupo* e *hora do dia* ($F = 1.615$, $P = 0,071$) foram detectados.

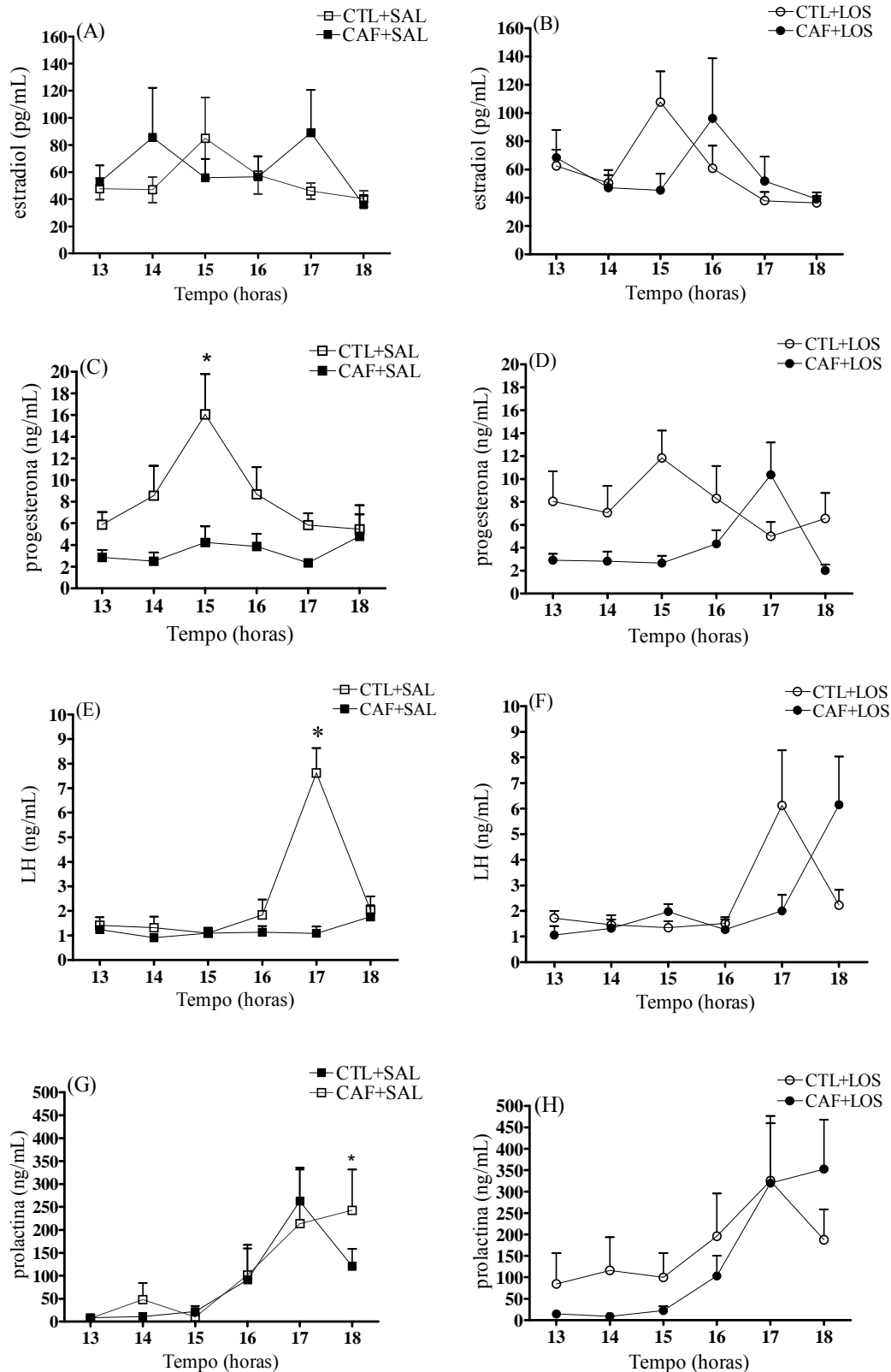


Figura 24. Efeito da dieta da cafeteria e da injeção de losartan a partir do desmame sobre as concentrações plasmáticas de estradiol ((A e B) pg/mL), de progesterona ((C e D) ng/mL), de LH ((E e F) ng/mL) e de prolactina ((G e H) ng/mL) na tarde do proestro de ratas Wistar adultas. Média \pm E.P.M. dos grupos controle + salina (CTL + SAL), controle + losartan (CTL + LOS), cafeteria + salina (CAF + SAL) e cafeteria + losartan (CAF + LOS).

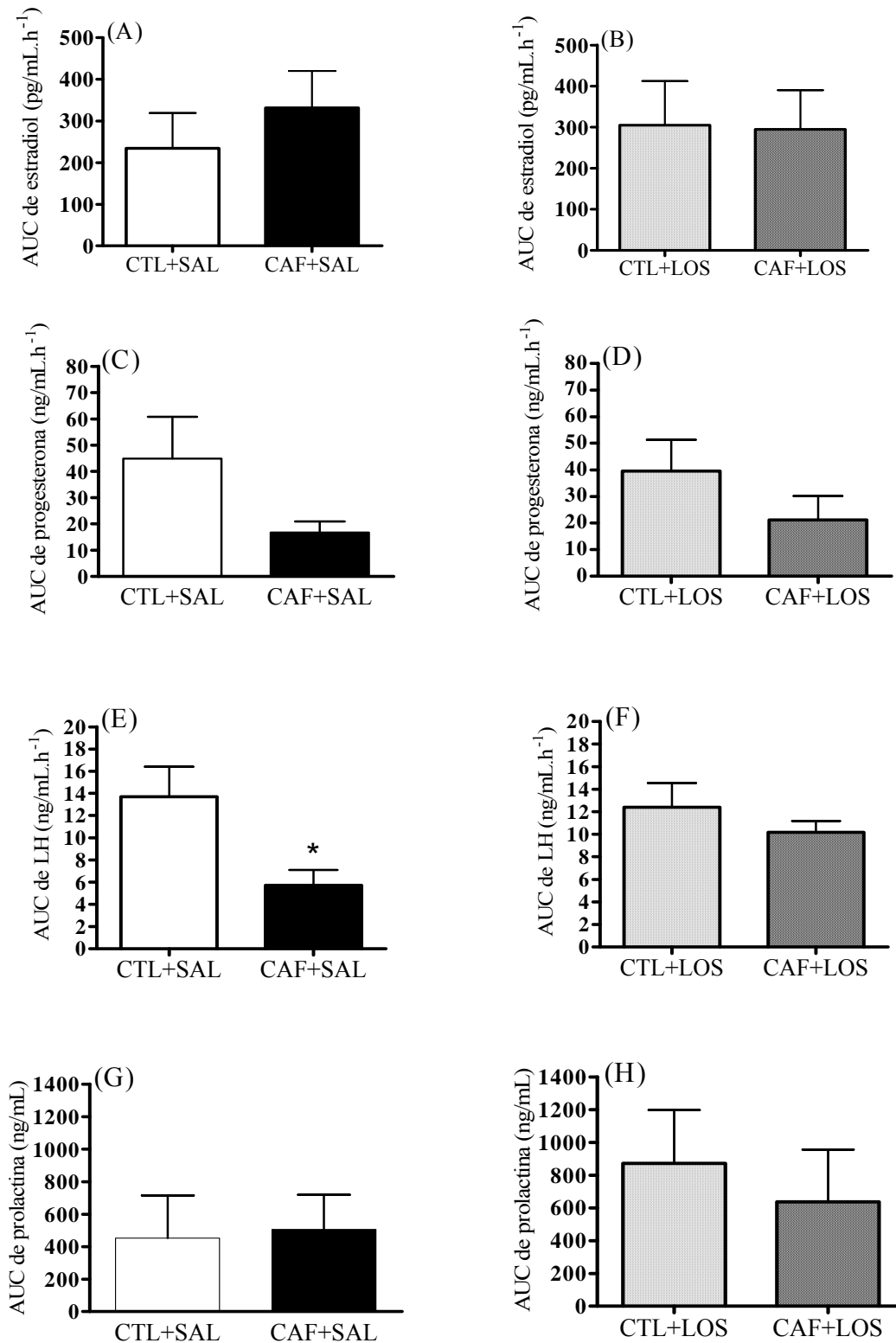


Figura 25. Efeito da dieta da cafeteria e da injeção de losartan a partir do desmame os AUCs de das concentrações plasmáticas de estradiol ((A e B) pg/mL), de progesterona ((C e D) ng/mL), de LH ((E e F) ng/mL) e de prolactina ((G e H) ng/mL) na tarde do proestro de ratas Wistar adultas. Média \pm E.P.M. dos grupos controle + salina (CTL + SAL), controle + losartan (CTL + LOS), cafeteria + salina (CAF + SAL) e cafeteria + losartan (CAF + LOS).

Tanto o grupo CTL + SAL quanto o grupo CTL + LOS não diferiram entre si em todos os horários e apresentaram picos de LH às 1700 h, que foram significativamente diferentes dos demais horários avaliados dentro destes grupos e das concentrações de LH nos demais horários nos grupos CAF + SAL e CAF + LOS. O grupo CAF + SAL não apresentou elevações nas concentrações de LH em nenhum dos horários na tarde do proestro, que permaneceram iguais em todos os tempos.

Um aumento nas concentrações de LH foi verificado às 1800 h no grupo CAF + LOS, diferindo dos outros horários nesse grupo e das concentrações de LH às 1800 h nos grupos CTL + SAL, CTL + LOS e CAF + SAL, demonstrando que a administração do antagonista de Angiotensina II reverteu o bloqueio do pico pré-ovulatório de LH induzido pela ingestão da dieta da cafeteria.

A análise da AUC das concentrações de LH evidenciou uma redução no grupo CAF + SAL comparada com o grupo CTL + SAL e ausência de diferença entre os grupos CTL + SAL, CTL + LOS e CAF + LOS. Efeitos significativos para *grupo* ($F = 3.856$, $P = 0.010$), *hora do dia* ($F = 9.880$, $P < 0.0001$) e interação entre *grupo* e *hora do dia* ($F = 5.073$, $P < 0.0001$) foram detectados.

As concentrações de prolactina não diferiram entre os respectivos horários entre os grupos avaliados. A partir das 1600 h, em todos os grupos, as concentrações de prolactina começaram a se elevar, alcançando valores significativamente elevados as 1700 e 1800 h no grupo CAF + LOS em relação às 1300 e 1400 h e às 1700 h no grupo CTL + SAL em relação aos demais horários. Nos grupos CTL + LOS e CAF + SAL não foi evidenciada diferença significativa entre os horários. Nenhum efeito significativo para *grupo* ($F = 1.505$, $P = 0.2140$) e interação entre *grupo* e *hora do dia* ($F = 0.493$, $P = 0.943$) foi detectado. Um efeito significativo para *hora do dia* foi detectado ($F = 6.988$, $P < 0.0001$).

A análise da AUC das concentrações de prolactina não evidenciou diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos estudados.

5. DISCUSSÕES

5.1. Experimento 1: Efeito da dieta da cafeteria, introduzida a partir do desmame, sobre processos reprodutivos em ratas

A literatura tem evidenciado há muitos anos a forte relação existente entre a obesidade e desordens reprodutivas femininas. Em mulheres obesas, entre as alterações constatadas, incluem-se a antecipação da instalação da puberdade, o prolongamento do ciclo reprodutivo, ciclos anovulatórios e redução nas taxas de gravidez. Sobre o comportamento sexual, o efeito da obesidade ainda é controverso, com alguns estudos demonstrando redução e outros nenhuma alteração no comportamento sexual de mulheres obesas, comparadas com mulheres não-obesas. Adicionalmente, foram relatados hiperandrogenismo, redução nas concentrações de globulinas ligadoras de esteróides sexuais, redução de metabólitos de estrógenos e progesterona e reduzidas concentrações de LH em mulheres que apresentam obesidade.

Os modelos experimentais animais representam uma ferramenta importante na busca pela compreensão dos efeitos da obesidade sobre o eixo hipotálamo-hipófise em gônadas em fêmeas. Em fêmeas obesas de roedores foram descritos a abertura vaginal antecipada, o prolongamento do ciclo estral, a redução no desenvolvimento folicular nos ovários, bem como a redução na expressão de GnRH em neurônios hipotalâmicos em relação aos respectivos parâmetros em animais de grupos controles.

Até o momento, não existiam dados disponíveis sobre a receptividade sexual e nem relatos sobre o perfil das concentrações plasmáticas dos principais hormônios envolvidos no controle da função reprodutiva em fêmeas de modelos experimentais animais de obesidade, que são essenciais para a compreensão dos mecanismos envolvidos nos efeitos do excesso de gordura corporal sobre a efetividade funcional da reprodução.

Em mulheres obesas, esses parâmetros ou semelhantes já foram verificados, no entanto, entendemos a necessidade de se avaliar e tentar compreender todos esses mecanismos também nos modelos experimentais animais, para após, se tentar correlacionar e estender os conhecimentos adicionais

(que até então só são realizados em animais em condições experimentais, como a expressão de proteínas em estruturas no sistema nervoso central), em todo seu contexto, para a fisiologia humana.

Neste sentido, no presente trabalho, avaliamos a receptividade sexual, a ovulação na manhã da fase estro do ciclo estral e o perfil de LH, estradiol, progesterona e prolactina na fase de proestro (fase que precede o estro) e nos horários (tarde do proestro) em que esses hormônios apresentam um pico no sentido de se induzir a ovulação na manhã do estro e a receptividade sexual na noite do proestro, período em que a fertilização é mais provável.

Nessa tese, a dieta conhecida como cafeteria foi utilizada para a indução da obesidade. Como a obesidade humana, as dietas de indução de obesidade são condições poligênicas que refletem a interação da predisposição genética com o ambiente externo e a interpretação das causas ou possíveis tratamentos para os efeitos da obesidade não são complicados por anormalidades fisiológicas induzidas por lesões eletrolíticas, por injeções de drogas em núcleos centrais ou alterações genéticas.

A oferta da dieta da cafeteria foi iniciada logo após o desmame e por tempo prolongado (até a idade adulta), tendo em vista o dramático aumento da incidência da obesidade em crianças e o fato de que um as alterações nas funções reprodutivas são diretamente proporcionais à duração da dieta.

Com o objetivo de correlacionar algumas alterações metabólicas características e associadas à obesidade, nós realizamos um teste intravenoso de tolerância à glicose e dosamos as concentrações de triglicerídeos e colesterol nas fêmeas avaliadas. Verificamos que a dieta da cafeteria induziu o desenvolvimento de obesidade e da resistência a insulina. Além disso, o aumento de gordura corporal e as alterações associadas promoveram redução na capacidade reprodutiva das fêmeas avaliadas.

A dieta da cafeteria, como esperado, aumentou o peso dos coxins adiposos aos 30 dias de idade, perdurando até a idade adulta das ratas, semelhante aos ratos que ingerem a dieta da cafeteria introduzida na vida adulta (Prada *et al.* 2005; Shafat *et al.* 2009). Ao avaliarmos a ingestão alimentar das fêmeas do grupo cafeteria verificamos ainda que nos dois primeiros dias de oferta da dieta, uma maior ingestão alimentar em gramas pelo grupo cafeteria comparado com o grupo controle. Estudos demonstram que a

dieta da cafeteria induz um rápido aumento na ingestão nos primeiros dias de oferta (Llado *et al.* 1995), devido à maior palatabilidade dessa dieta comparada com a ração para ratos (Sclafani & Springer 1976). Posteriormente, apesar do fato de, na maior parte do experimento, a ingestão alimentar no grupo controle foi maior em gramas do que no grupo cafeteria, na análise da quantidade de energia ingerida ao longo do experimento, verificamos uma maior ingestão de energia pelo grupo cafeteria desde o 8º dia até o final do experimento, devido à maior densidade energética dos alimentos na dieta da cafeteria, o que pode ter induzido um acúmulo de gordura maior nestas fêmeas e maior aumento gradativo de peso corporal, chegando a atingir valores de peso corporal maiores que nas fêmeas do grupo controle a partir da metade do período de análise.

Além disso, a dieta da cafeteria promoveu redução na tolerância à glicose, possivelmente por alterar a secreção de insulina induzida por glicose, como demonstrado pela análise do HOMA. A normoglicemia de jejum deve ser resultante da hiperinsulinemia de jejum observada nesses animais. De fato, ratos (Pi-Sunyer 2002; Prada *et al.* 2005) e camundongos (Martins *et al.* 2008) obesos não apresentam aumento nas concentrações de glicose de jejum, por aumento compensatório nas concentrações de insulina.

Nossos resultados estão de acordo com estudos que demonstram que a obesidade promove a resistência à insulina em modelos experimentais animais (Llado *et al.* 1995; Prada *et al.* 2005) e em humanos (Jahns *et al.* 2001; Chopra *et al.* 2002). Elevadas concentrações de triglicerídeos e colesterol LDL, bem como reduzidas concentrações de colesterol HDL foram detectadas nas fêmeas do grupo cafeteria em nosso estudo, confirmando estudos anteriores em animais obesos (Friedman & Kim 1985; Kretschmer *et al.* 2005).

Além dos efeitos metabólicos esperados, a dieta da cafeteria induziu no ciclo estral e na capacidade reprodutiva das fêmeas. Foi verificada uma antecipação da instalação da puberdade nas fêmeas do grupo cafeteria, semelhante à observada por (Kennedy & Mitra 1963). A obesidade antecipa a data da instalação da puberdade em ratas (Kennedy & Mitra 1963) e em meninas (Frisch & McArthur

1974). O maior fator para a maturação precoce em meninas parece estar associado ao aumento do índice de massa corporal (IMC). Vários fatores predisõem aos aumentos do IMC, incluindo aumento no consumo de alimentos ricos em calorias (Jahns *et al.* 2001).

No presente trabalho, verificamos que a dieta da cafeteria aumentou significativamente a quantidade das gorduras avaliadas aos 30 dias, idade próxima à instalação da puberdade em ratas. Possivelmente, algum fator derivado e/ou associado ao tecido adiposo deve estar contribuindo para essa antecipação. Alguns estudos (Helmreich & Cameron 1992; Cameron 1996) sugerem que existe um mecanismo dinâmico sensível à disponibilidade de energia para o controle da função reprodutiva e da puberdade. Várias evidências têm indicado a leptina, um peptídeo sintetizado no tecido adiposo como sendo este fator, considerando que suas concentrações aumentam com a instalação da puberdade (Garcia-Mayor *et al.* 1997; Ahmed *et al.* 1999) e que a leptina induz uma precocidade na abertura vaginal em camundongos (Ahima *et al.* 1997; Chehab *et al.* 1997) e previne o atraso instalação da puberdade de ratos fêmeas em jejum (Cheung *et al.* 1997; Gruaz *et al.* 1998). Por outro lado, alguns trabalhos indicam que as concentrações de leptina não são alteradas na puberdade em macacos e humanos (Urbanski & Pau 1998) e que a instalação da puberdade não é alterada em mulheres com deficiência à leptina e que receberam leptina recombinante (Farooqi *et al.* 2001). Estes resultados mantêm a controvérsia na questão referente ao mecanismo através do qual o acúmulo de gordura induz a antecipação da instalação da puberdade.

Em nosso estudo, um aumento no tempo da fase de diestro 2 foi observado nas fêmeas obesas, o que induziu um prolongamento do ciclo estral dessas ratas, confirmando dados obtidos em estudos anteriores em roedores submetidos a dietas hipercalóricas (Innami *et al.* 1973; Glick *et al.* 1990). Menstruações irregulares associadas a ciclos anormais e longos também têm sido verificadas em mulheres obesas em vários estudos (Mitchell & Rogers 1953; Hartz *et al.* 1979; Friedman & Kim 1985; Norman & Clark 1998; Bolumar *et al.* 2000; Wei *et al.* 2009). Considerando que a progesterona apresenta, além do pico derivado da fase folicular, um segundo pico, de origem luteal no diestro 1 (Butcher *et al.* 1974; Smith *et al.* 1975) e que a progesterona possui efeito indutor da fase de diestro 2, por promover a

diferenciação das células para leucócitos, que caracterizam essa fase (Santoro *et al.* 2004), poderíamos supor que o prolongamento do tempo de diestro 2 nas ratas submetidas à dieta da cafeteria poderia ter sido induzido por elevações mais duradouras de progesterona de origem luteal. No entanto, em mulheres obesas, redução de progesterona na fase lútea foram descritas (Sherman & Korenman 1974; Grenman *et al.* 1986), o que descartaria a hipótese proposta se esse mesmo padrão de redução da progesterona na fase lútea nas ratas obesas fosse confirmado.

A receptividade sexual das ratas não foi alterada pela ingestão da dieta da cafeteria. As reduzidas concentrações de progesterona, juntamente com as elevação de estradiol, mesmo na ausência de seu respectivo pico pré-ovulatório e mesmo com o aumento significativo nas concentrações de prolactina, como verificado no final da fase do proestro mantiveram o comportamento sexual das ratas do grupo cafeteria semelhante ao do grupo controle. O efeito da obesidade sobre o comportamento sexual em fêmeas ainda se mostra controverso. Em mulheres, alguns estudos demonstram falta de desejo sexual e dificuldades na performance sexual entre mulheres obesas (Bajos *et al.*; Esposito *et al.* 2003; Kolotkin *et al.* 2006). Por outro lado, outro estudo demonstrou ausência de diferença no comportamento sexual, incluindo o desejo sexual de mulheres obesas quando comparadas com mulheres não-obesas (Bajos *et al.*).

Adicionalmente, um estudo demonstrou que ratas com diabetes induzido pela administração de estreptozotocina apresentam redução do comportamento sexual devido à hiperinsulinemia (Karkanias *et al.* 1997). Em nosso estudo, a dieta da cafeteria não alterou o comportamento sexual das fêmeas avaliadas, apesar de apresentarem hiperinsulinemia de jejum. A manutenção da receptividade sexual no presente experimento, mesmo com as alterações endócrinas, pode estar associada à manutenção da dieta hipercalórica. Quando são mantidos substratos energéticos disponíveis para oxidação na dieta, o comportamento sexual das fêmeas diabéticas é mantido (Karkanias *et al.* 1997). Por exemplo, em fêmeas diabéticas não tratadas, apesar de possuir grande quantidade de calorias na circulação, a glicose não está

disponível para oxidação. Se estas fêmeas são alimentadas com dietas ricas em ácidos graxos, uma fonte de energia oxidável para diabéticos, o comportamento sexual é reestabelecido (Levi & Weinberg 1949).

Em nossos resultados, constatamos que as concentrações de estradiol das fêmeas do grupo cafeteria não diferiram das do grupo controle, diferindo dos dados que correlacionam significativamente a taxa de produção de estrógenos com a quantidade de gordura corporal (Kirschner *et al.* 1982). Fêmeas com fenótipo de obesidade abdominal possuem menores concentrações de SHBG em comparação a mulheres com obesidade periférica (Pasquali *et al.* 1993), o que pode promover hiperandrogenismo e aumento de estrógenos livres aos tecidos-alvo (Kirschner *et al.* 1982; von Schoultz & Carlstrom 1989). No entanto, a obesidade está associada com uma redução na formação de metabólitos inativos de 17β -estradiol, que são virtualmente derivados da atividade estrogênica periférica e uma maior produção de éster sulfato, um importante reservatório de estrógenos ativos (von Schoultz & Carlstrom 1989). Essas alterações em conjunto resultam em um aumento da taxa de estrógenos inativos. Assim, as concentrações plasmáticas de estrógenos são usualmente normais em mulheres com diferentes fenótipos de obesidade, apesar da produção de estrógenos ser aumentada em mulheres obesas (Pasquali *et al.* 1993; De Pergola *et al.* 2006).

Por outro lado, constatamos neste estudo, que as concentrações de estradiol das fêmeas do grupo cafeteria apresentaram um padrão de elevação e redução em suas concentrações na tarde do proestro e, apesar de não apresentarem diferenças nos maiores valores (às 16 e 18 horas) após o pico às 14 horas com os respectivos horários das fêmeas do grupo controle, quando comparadas às suas concentrações que nos horários que não apresentaram elevações (13, 15 e 17 horas), as fêmeas do grupo cafeteria apresentaram elevação significativa.

Sobre as concentrações de progesterona na tarde do proestro, a dieta da cafeteria inibiu o pico pré-ovulatório deste esteróide. A progesterona é secretada pelo folículo dominante, responsável pelo aumento nas concentrações plasmáticas de progesterona na tarde do proestro (Arai *et al.* 1998; Bao *et al.* 2000). As fêmeas do grupo cafeteria em nosso estudo não apresentaram diferença no peso em relação ao grupo

controle. Trabalhos recentes (Menezes, 2010) realizados por nosso grupo de pesquisa (não publicados) evidenciaram ausência de alteração no número de folículos antrais, primários e secundários, entretanto, uma redução no número de folículos pré-antrais e da espessura da camada da teca dos folículos antrais foram constatados em fêmeas do grupo cafeteria. A redução dos folículos pré-ovulatórios e a redução da espessura da camada das células da teca, neste estágio pode ter promovido a redução da capacidade esteroidogênica pelo folículo pré-ovulatório.

Conforme referimos anteriormente, à medida que o folículo se aproxima do final da fase antral do desenvolvimento, as células da granulosa, que apresentam baixa atividade da enzima C17,20-liase (que converte progestágenos a andrógenos), passam a produzir quantidades aumentadas de progesterona, além de manterem a conversão de andrógenos a estrógenos. Além disso, nesse período pré-ovulatório, contribui para o aumento da síntese de progestágenos o fato de a camada das células da granulosa, que era avascular, passar a ser invadida por vasos provenientes da teca (Anselmo-Franci & Szawka, 2005). Essa neovascularização da camada granulosa resulta em aumento do aporte do substrato (colesterol) para a síntese de esteróides, o que constitui um fator decisivo para o aumento agudo da secreção de progestágenos na fase pré-ovulatória. Nesse sentido, a redução da espessura da camada da teca dos folículos antrais, bem como a redução no desenvolvimento dos folículos pré-antrais, poderia estar promovendo a redução na secreção de progesterona, evidenciado pela ausência do pico deste esteróide na tarde do proestro nas fêmeas do grupo cafeteria.

A dieta da cafeteria ainda promoveu uma redução significativa no número de oócitos liberados na manhã do estro. Estes resultados estão de acordo com trabalhos que demonstram ainda que ratas com obesidade induzida pela dieta da cafeteria apresentam redução no número de concepções (Shaw *et al.* 1997). A redução na ovulação induzida pela ingestão da dieta da cafeteria é provavelmente derivada de alterações nos perfis de secreção dos hormônios envolvidos no controle da reprodução.

Nos verificamos ausência do pico pré-ovulatório de LH nas fêmeas do grupo cafeteria comparadas com as suas concentrações do grupo controle. Similarmente, em mulheres obesas, são observadas

reduzidas concentrações de LH e FSH (Grenman *et al.* 1986; Santoro *et al.* 2004; Jain *et al.* 2007). Nessas mulheres, os pulsos de LH são normais, mas de menor amplitude, resultando na redução das concentrações plasmáticas de LH (Grenman *et al.* 1986; Jain *et al.* 2007).

O efeito da obesidade sobre a secreção de LH também é observado em mulheres com a síndrome de ovários policísticos. Elevadas concentrações de LH são comumente observadas em mulheres que apresentam síndrome do ovário policístico e não são obesas (Gambineri *et al.* 2002). Por outro lado, as concentrações de LH são inversamente relacionadas à gordura corporal e a obesidade reduz a amplitude do pulso de LH e a resposta do LH ao GnRH em mulheres obesas que apresentam síndrome do ovário policístico (Gambineri *et al.* 2002). Isto implica que a obesidade atenua a responsividade da secreção alterada de LH, assim como observamos em nossos resultados nas fêmeas do grupo cafeteria.

A ausência do aumento de progesterona provavelmente seja um dos responsáveis pela ausência do pico de LH observado nas fêmeas que ingeriram a dieta da cafeteria. Se considerarmos o fato de que em ratas, o aumento de progesterona produzida pelo folículo dominante induz, após a pré-exposição a elevadas concentrações de estradiol, a ocorrência do pico pré-ovulatório de GnRH (Smith *et al.* 1975; Freeman 1994; Hotchkiss J; Knobil 1994; Levine 1997; Herbison 1998; Micevych *et al.* 2003), e que um estudo verificou uma supressão de 50% na expressão de GnRH nos camundongos fêmeas obesas DBA/2J (Tortoriello *et al.* 2004), poderíamos inferir que a ausência do aumento de progesterona na tarde do proestro estaria contribuindo para a ausência do pico de LH nas fêmeas do grupo cafeteria.

Entretanto, estudos em macacas (Wildt *et al.* 1981) e em ovelhas (Kaynard *et al.* 1988; Moenter *et al.* 1990) demonstraram que o pico de gonadotrofinas pode ser induzido apenas pelo estradiol, sem a necessidade do aumento posterior de progesterona. Assim, alternativamente, poderíamos supor que, apesar de não apresentar diferença entre o perfil de elevação e redução das concentrações plasmáticas do estradiol nas fêmeas do grupo cafeteria verificado em nosso trabalho, apesar de não diferir do grupo controle, poderia estar promovendo um mecanismo de retroalimentação negativo ao invés do mecanismo de retroalimentação positivo sobre a síntese de GnRH no hipotálamo e contribuindo para a inibição do

pico de LH. Suportando essa suposição, um estudo verificou que para que os efeitos estimulatórios dos estrógenos sobre a síntese de GnRH no proestro ocorram, é necessário que suas concentrações sejam cronicamente elevadas por, pelo menos, um período de 15 horas, em ratas (Herbison 1998).

Verificamos também um efeito da dieta da cafeteria sobre a secreção pré-ovulatória de prolactina. O último horário avaliado, as concentrações de prolactina, que estavam elevando-se em ambos os grupos, permaneceu elevado no grupo cafeteria em relação ao grupo controle, que apresentou redução. Os esteróides ovarianos poderiam estar contribuindo para este perfil. O tratamento com estrógeno estimula a secreção de prolactina (CALIGARIS *et al.*, 1974), através da redução da resposta dos lactotrofos à dopamina (LIVINGSTONE *et al.*, 1998). Além disso, estimula as células da hipófise a produzir (ARBOGAST & VOOGT, 1994) e a secretar PRL (HASHI *et al.*, 1996) e promove um aumento na transcrição do gene da PRL (MAURER *et al.*, 1990). Assim, considerando que nas fêmeas do grupo cafeteria, verificamos um padrão de elevações e reduções nas concentrações de estradiol, este perfil talvez possa ter estimulado um aumento mais prolongado da secreção de prolactina nessas fêmeas.

Apesar da relação entre a obesidade e a reprodução feminina estar bem estabelecida, os mecanismos através dos quais a obesidade influencia a reprodução e os fatores mediadores desses efeitos são ainda pouco esclarecidos.

Uma das alterações metabólicas mais evidentes e característica de ratas obesas é a resistência à insulina, verificada em nossos resultados nos animais do grupo cafeteria. Entendemos que o aparecimento de resistência à insulina não é uniforme em relação aos tecidos-alvo desse hormônio, nem em relação às vias intracelulares ativadas pela insulina. Desta forma, ao mesmo tempo em que a resistência à insulina pode afetar negativamente certas funções metabólicas desse hormônio, a hiperinsulinemia compensatória pode intensificar ou prejudicar outras. De fato, apesar da administração exógena de insulina apresentar efeito estimulatório sobre a secreção de LH em mulheres saudáveis (Moret *et al.* 2009), a hiperinsulinemia crônica parece induzir uma redução da amplitude do pulso de LH (Karkanias *et al.* 1997) e está

relacionada à produção de androgênios em excesso pelas células da teca nos ovários (Poretsky *et al.* 1999).

Elevações de insulina inibem a síntese de SHBG pelo fígado, contribuindo para a redução de suas concentrações e em consequência, para o aumento da taxa de andrógenos livres no plasma (Poretsky *et al.* 1999; Gambineri *et al.* 2002). Estudos revelam que o ambiente com elevações plasmáticas de andrógenos promove atresia folicular em ratos (Hillier & Ross, 1979; Billig ET AL, 1993) e aumenta a apoptose das células da granulosa, além de inibir tanto o crescimento como o desenvolvimento folicular (FArookhi, 1985), como resultado, há uma redução no desenvolvimento dos folículos ovarianos e a anovulação é favorecida (Willis *et al.* 1996; Poretsky *et al.* 1999; Bruning *et al.* 2000).

Essa associação entre o hiperandrogenismo e a anovulação em mulheres em estágio reprodutivo na obesidade é suportada pela forte associação existente entre a obesidade e a síndrome do ovário policístico, a mais comum desordem hiperandrogênica (Yen, 1980; Franks, 1989). A obesidade aumenta a prevalência das taxas de síndrome do ovário policístico (Haslan & James, 2005) e amplifica esta desordem (Gambineri ET AL, 2002). Além de hiperandrogenismo, as mulheres obesas com ovário policístico apresentam resistência à insulina (Gambineri ET al, 2002), que deve contribuir para a alteração das ovulações espontânea e induzida observadas nessas mulheres (Gambineri ET AL, 2002).

Por promover a lipogênese, a insulina ainda deve aumentar a produção de fatores derivados dos adipócitos, como a leptina (Maffei *et al.* 1995; Vicennati *et al.* 1998), cujas concentrações estão elevadas na obesidade (Maffei *et al.* 1995). Experimentos indicaram que a leptina antagoniza os efeitos estimulatórios do LH sobre as células ovarianas (Spicer & Francisco 1997; Agarwal *et al.* 1999). Elevações de leptina no ovário podem interferir no desenvolvimento dos folículos dominantes e maturação dos oócitos. A infusão exógena de leptina tem demonstrado reduzir significativamente a ovulação em ratas (Duggal *et al.* 2000). No entanto, se a leptina na circulação ou nos tecidos ovarianos exerce papel na determinação da anovulação em fêmeas obesas ainda é desconhecido.

Além disso, experimentos demonstram o hormônio liberador de corticotrofinas (CRH) tem sido relacionado com a redução na secreção de GnRH e LH (Meczekalski *et al.* 2000). Esta ação dos neurônios CRH em inibir o eixo gonadal se dá por inervação direta ou indireta, agindo diretamente nos neurônios GnRH inibindo-os, ou sobre neurônios proopiomelanocorticonérgicos (POMC) no núcleo arqueado promovendo sua liberação e consecutiva inibição dos neurônios GnRH; toda esta ação resulta em uma supressão da secreção de GnRH, e consequente inibição da onda pré-ovulatória de gonadotrofinas e da ovulação (Rivest & Rivier 1995; Chrousos *et al.* 1998). Considerando que as concentrações de cortisol correlacionam positivamente com a quantidade de tecido adiposo em mulheres (Grenman *et al.* 1986) e que modelos experimentais animais de obesidade apresentam elevadas concentrações de corticosteróides (Dolnikoff *et al.* 1988; Rhodes *et al.* 2002), se em nosso modelo de obesidade, um aumento na ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal estiver ocorrendo, pode estar contribuindo de forma importante para a redução na ovulação observada nas fêmeas do grupo cafeteria.

5.2. Experimento 2: Efeito da associação da administração de losartan com a dieta da cafeteria, introduzidos a partir do desmame, sobre processos reprodutivos em ratas

É bem estabelecido que a Ang II apresenta um papel chave e essencial na regulação de fluidos e eletrólitos. Em consequência, é um dos principais reguladores da pressão arterial. Desta forma, muitos inibidores da enzima de conversão de Ang II e bloqueadores do receptor AT_1 são comumente utilizados como drogas antihipertensivas.

Evidências clínicas recentes têm revelado que esses agentes apresentam outros benefícios metabólicos como a redução da hipertrigliciridemia e o aumento na sensibilidade à insulina em indivíduos que apresentam resistência à insulina hipertensos ou não.

Um outro papel exercido pela Ang II é sobre a regulação da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas em fêmeas. Uma grande quantidade de estudos demonstra essa relação, incluindo aumento do conteúdo hipotalâmico pré-ovulatório de Ang II, o efeito estimulatório da Ang II sobre a secreção de LH na presença de esteróides gonadais e diretamente sobre a maturação dos oócitos e ruptura dos folículos maduros (Ang II ovariana) e seus efeitos diversos sobre o comportamento sexual.

Apesar de todas essas evidências, o significado fisiológico e se existe associação com suas ações sobre a pressão arterial e seus efeitos metabólicos ainda necessitam ser esclarecidos.

Neste sentido, nesse estudo avaliamos uma possível participação do peptídeo Ang II na modulação das alterações reprodutivas apresentadas por fêmeas obesas. Para tanto, foi utilizada a injeção intraperitoneal do antagonista do receptor AT_1 de Ang II durante todo o período de oferta da dieta da cafeteria. Verificamos que o tratamento crônico com losartan previne a instalação da obesidade, da resistência à insulina, evita a redução na ovulação, e a ausência dos picos pré-ovulatórios de LH e de progesterona induzidos pela ingestão da dieta da cafeteria.

A administração do antagonista losartan de Ang II não alterou a ingestão alimentar em gramas e em energia entre os grupos controles. No entanto, nas fêmeas do grupo cafeteria, o losartan promoveu, a

partir do 31º dia até o final do experimento, um aumento na quantidade de alimento ingerido pelo grupo cafeteria + losartan, aumentando ainda mais o aporte de calorias neste grupo. Trabalhos prévios demonstraram que a Ang II central (Porter & Potratz 2004) reduz a ingestão alimentar em ratos. Considerando que o losartan e seu metabólito ativo EXP3174 (Hartz *et al.* 1979) atravessam a barreira hematoencefálica (Fregly & Rowland 1991; Song *et al.* 1991; Li *et al.* 1993; Zhuo *et al.* 1994; Polidori *et al.* 1996; Polidori *et al.* 1998; Culman *et al.* 1999; Wang *et al.* 2003), é provável que a administração *ip* do antagonista tenha bloqueado os efeitos inibitórios centrais da Ang II sobre a ingestão alimentar.

Interessante, verificamos que o aumento no aporte de calorias não promoveu aumento de gordura corporal nos animais do grupo cafeteria + losartan, que apresentaram redução significativa dos pesos das gorduras em relação aos maiores conteúdos de gorduras corporais induzidos pela dieta, o que demonstra um efeito inibitório do losartan no acúmulo de gordura e peso corporal no grupo cafeteria. Confirmando essa redução de acúmulo de gordura induzido pela inibição dos efeitos da Ang II, estudos demonstram que a administração de losartan reduz o peso do tecido adiposo e o tamanho dos adipócitos em camundongos diabéticos (Tomono *et al.* 2008) e a deficiência genética de angiotensina promove atenuação de ganho de peso corporal e adiposidade (Kouyama *et al.* 2005). Ainda, camundongos angiotensinogênio-deficientes, expostos à ingestão regular de ração ou de dieta rica em gordura, exibem massa de tecido adiposo reduzida e seus adipócitos são menores que dos ratos do grupo controle (Massiera *et al.* 2001).

Para complementar os efeitos do losartan sobre o acúmulo de gorduras, no presente estudo, o losartan induziu redução na resistência à insulina induzida pela dieta da cafeteria. De fato, a ativação do sistema renina-angiotensina está relacionada à redução da sinalização da insulina e resistência à insulina em tecidos como o músculo esquelético e o fígado (Fukuda *et al.* 2001; Kurtz & Pravenec 2004), bem como em outros tecidos alvo para ação da insulina, incluindo o cardíaco, o vascular e o renal (Lastra *et al.* 2006). Ratos deficientes de angiotensinogênio apresentam redução da resistência à insulina induzidos por dieta (Kouyama *et al.* 2005). A Ang II reduz a fosforilação de tirosina estimulada por insulina (Velloso *et*

al. 1996), enquanto aumenta a fosforilação de serina no substrato do receptor de insulina (IRS-1) e da fosfatidilinositol-3-quinase, reduzindo a sinalização pelo receptor de insulina (Sykiotis & Papavassiliou 2001). Tanto a redução da fosforilação em tirosina quanto o aumento da fosforilação em serina do receptor de insulina e do IRS-1, foram propostos como mecanismos moleculares de resistência à insulina (Tanti *et al.* 1994; Mothe & Van Obberghen 1996; Sykiotis & Papavassiliou 2001). A administração do antagonista losartan do receptor AT₁ de Ang II aumenta a translocação do receptor GLUT-4 (Hoenack & Roesen 1996), além de evitar o acúmulo de lipídios em tecidos como o músculo esquelético, fígado e pâncreas (Janke *et al.* 2002), retardando ou evitando o início do diabetes, através da redução da intolerância à glicose (Sharma *et al.* 2002; Pfeffer *et al.* 2003; Julius *et al.* 2004; Shiuchi *et al.* 2004; Kjeldsen *et al.* 2006), semelhante aos nossos resultados.

Um menor conteúdo de triglicerídeos e atividade da sintase de ácidos graxos em camundongos angiotensinogênio-deficientes, expostos à ingestão regular de ração ou de dieta rica em gordura (Massiera *et al.* 2001), o que poderia explicar, pelo menos parcialmente, em nossos resultados. A redução das concentrações de triglicerídeos nos animais do grupo cafeteria com administração de losartan em comparação aos animais do grupo cafeteria que receberam solução salina, apontando nesta direção. Adicionalmente, a redução nas concentrações de colesterol LDL e aumento nas concentrações de colesterol HDL nas fêmeas do grupo cafeteria com administração de losartan demonstrou os efeitos benéficos do bloqueio dos receptores AT₁ sobre as alterações patológicas no metabolismo de lipídios na obesidade.

A administração de losartan, além de inibir as alterações metabólicas deletérias promovidas pela ingestão da dieta da cafeteria, alterou/preveniu alguns efeitos da dieta sobre a capacidade reprodutora das fêmeas. Na análise da data da instalação da puberdade, verificamos que os grupos cafeteria + losartan e cafeteria + salina não diferiram significativamente na data da abertura vaginal. Como discutido anteriormente, o aumento de gordura corporal está relacionado a uma antecipação da instalação da puberdade em ratos (Kennedy & Mitra 1963). Em nossos resultados, verificamos que o losartan reduziu

significativamente o peso das gorduras do grupo cafeteria + losartan quando comparado com o grupo cafeteria + salina, aos 30 dias de idade, porém ainda se mantendo maiores do que os pesos das gorduras nos grupos controles. Assim sendo, poderíamos inferir que a redução da gordura induzida pelo bloqueio dos receptores de Ang II pode ter evitado parcialmente, a abertura vaginal precoce das fêmeas do grupo cafeteria. A Ang II poderia ainda estar agindo indiretamente através do estímulo de outro fator associado ao tecido adiposo, como a leptina. Tanto a Ang II sintetizada nos adipócitos, quanto a administração exógena de Ang II, estimula a secreção de leptina, produzida e secretada pelos adipócitos e que parece induzir a antecipação da instalação da puberdade (Zeinoaldini *et al.* 2006). A ausência de diferença verificada entre o peso das gorduras do grupo cafeteria + losartan e os grupos controles talvez possa sinalizar a necessidade de uma redução ainda maior do acúmulo de gordura nas fêmeas obesas induzido pelo bloqueio dos receptores de Ang II e do fator associado e/ou derivado.

Nossos resultados mostraram que a dieta da cafeteria aumentou a frequência do diestro 2 no grupo cafeteria quando comparado com o grupo controle e que houve um prolongamento ainda maior desta fase induzida pela injeção de losartan. Assim, a Ang II parece reduzir o aumento maior da fase de diestro 2, induzido pela dieta da cafeteria. Conforme discutido no experimento 1 e considerando que a diferenciação das células em leucócitos característica do diestro é induzida principalmente pela progesterona (Santoro *et al.* 2004), poderíamos supor que o losartan estaria induzindo um aumento ou prolongamento das elevações nas concentrações de progesterona de origem luteal (antes do diestro 2) nessas fêmeas. No entanto, novos estudos serão necessários para tentar esclarecer esse mecanismo.

No presente trabalho, a relação número de lordoses / número de montas não foi alterada nem pela obesidade e nem pela injeção *ip* do antagonista losartan no grupo cafeteria. O efeito da Ang II sobre o comportamento sexual é ainda controverso. Em condições fisiológicas, o bloqueio de ambos os subtipos de receptores de Ang II na amígdala medial não altera o comportamento sexual de ratas (Ceconello *et al.*). Em camundongos machos, o olmesartan, um bloqueador do receptor AT₁ de Ang II, ingerido na ração padrão, falhou em afetar o comportamento sexual (Nomura *et al.* 2007). A Ang II exerce efeitos

diversos, de acordo com a patofisiologia presente ou do sexo. Em situações de estresse agudo, os efeitos inibitórios do estresse sobre o comportamento sexual foram prevenidos pelo bloqueio dos receptores AT₁ e AT₂ de Ang II na amígdala medial (Ceconello *et al.*), enquanto que as administrações periféricas de losartan e PD12319 não alteraram esses efeitos (Donadio *et al.* 2007). Na hipertensão, o losartan não altera a função sexual em ratos machos (Ferrario & Levy 2002) e melhora a função sexual em homens (Chan *et al.* 1999) e em camundongos machos com diabetes tipo dois, a injeção periférica de olmesartan aumenta o número de ações comportamentais sexuais e reduz a latência à primeira monta (Nomura *et al.* 2007). Estudos em mulheres após a menopausa revelaram que a administração de Versatan, um bloqueador do receptor AT₁, promoveu um aumento na libido dessas mulheres (Fogari *et al.* 2004). Estes resultados somados aos nossos demonstram que o efeito da Ang II sobre o comportamento sexual é influenciado pelo sexo, espécie, metodologia de estudo e condições fisiológicas.

Sobre as concentrações de prolactina, verificamos o mesmo perfil de elevação prolongada nas fêmeas do grupo cafeteria + salina. Como sugerimos na discussão do experimento 1, este perfil pode estar sendo promovido pelo padrão de secreção (elevação/redução) alterado de estradiol. Adicionalmente, estudos demonstram que a progesterona, cujo pico pré-ovulatório foi reestabelecido nas fêmeas do grupo cafeteria em nosso estudo, também parece ter papel modulador na secreção de prolactina (JAHN, 1986). Quando administrada com estradogênio, a progesterona é capaz de potencializar a secreção de prolactina (CALIGARIS *et al.*, 1974; POLETINI, 1998).

Conforme verificamos no perfil de secreção de prolactina do grupo cafeteria + losartan em relação ao grupo cafeteria + salina, podemos constatar que o primeiro grupo parece apresentar um aumento (ou pico) apenas às 18 horas (ao invés de 17 horas como no grupo cafeteria + salina). Desta forma, se consideramos o fato de que o pico de progesterona nas fêmeas do grupo cafeteria + losartan ocorreu às 17 horas (ao invés de 15 horas como nos grupos controles), poderíamos postular que o pico de progesterona nesse grupo (mais tarde) possa ter deslocado, da mesma forma, o pico de prolactina para a direita.

Como verificado nesse trabalho em fêmeas com obesidade induzida precocemente pela dieta da cafeteria, há uma redução significativa no número de óvulos liberados por essas fêmeas. No entanto, um aumento no número de óvulos liberados pelas fêmeas do grupo cafeteria + losartan foi constatado em comparação com as fêmeas do grupo cafeteria + salina. Desta forma, o bloqueio dos receptores AT₁ de Ang II restaura a ovulação nas fêmeas obesas.

A administração de losartan no grupo cafeteria promoveu o reestabelecimento do aumento de progesterona, o que provavelmente contribuiu para a ocorrência do pico pré-ovulatório de LH na tarde do proestro nas fêmeas obesas. Estudos verificaram que os folículos antral e pré-ovulatório e o número de filhotes na ninhada são reduzidos em ratos transgênicos (mRen-2) que superexpressão a renina e a angiotensina e que a infusão de Ang II em ratas está associada com uma redução nos folículos antral e pré-ovulatório (de Gooyer *et al.* 2004). Considerando o aumento da atividade do sistema renina-angiotensina em indivíduos obesos (Licata *et al.* 1994; Umemura *et al.* 1997; Goodfriend *et al.* 1999), que um reduzido desenvolvimento folicular foi verificado em ovários de camundongos fêmeas com obesidade induzida por dieta (Tortoriello *et al.* 2004), poderíamos inferir que uma redução no desenvolvimento dos folículos ovarianos estaria sendo induzida por elevadas concentrações e/ou atividade da Ang II.

Diferindo de nossos resultados, estudos têm demonstrado uma inibição da ovulação associada à administração de bloqueadores de Ang II, como em ratas tratadas com indutores de ovulação (Bellver *et al.* 2003) e em ovários de coelhos fêmeas perfundidos *in vitro* (Yoshimura *et al.* 1992). Além disso, a administração de saralasin, um antagonista do receptor de Ang II e do enalapril, um inibidor da síntese de Ang II, administrado *icv* inibiu o pico pré-ovulatório de LH e ovulação em ratas quando administrado na manhã do proestro (Steele *et al.* 1983). No entanto, estes estudos foram realizados em fêmeas com concentrações fisiológicas de esteróides ovarianos e os efeitos da Ang II sobre a secreção de LH são dependentes da presença dos estrógenos e progesterona. Em ratas ovariectomizadas tratados com estrógeno e progesterona, a Ang II estimula a secreção de LH (Steele *et al.* 1985), o que explica o efeito inibitório da administração dos antagonistas de Ang II sobre o pico pré-ovulatório de LH e sobre a

ovulação nesses animais. Por outro lado, em ratas ovariectomizadas, a Ang II inibe a secreção pulsátil de LH. Desta forma, a ausência de pico de progesterona na tarde do proestro verificado nas fêmeas dos grupos cafeteria e cafeteria + salina no presente trabalho, apesar das concentrações de estradiol dessas fêmeas serem semelhantes às das fêmeas do grupos controle e controle + salina, pode estar exercendo efeitos semelhantes aos observados em ratas ovariectomizadas sem reposição de esteróides sexuais, inibindo o aumento nas concentrações de LH nas ratas obesas, considerando que o bloqueio dos receptores AT₁ pela administração de losartan reestabeleceu o pico pré ovulatório de LH na tarde do proestro nessas fêmeas.

Adicionalmente, a ausência de receptores para Ang II na membrana dos folículos pré-ovulatórios que apresentam receptores para o LH foi demonstrada (Daud *et al.* 1988), descartando uma possível ação direta da Ang II plasmática nos ovários. Por outro lado, a presença de receptores de Ang II no interior das células ovarianas foi verificado, indicando que a Ang II produzida localmente deve influenciar a função ovulatória. Ainda, o pico pré-ovulatório de LH promove um aumento nas concentrações de Ang II nos folículos pré-ovulatórios (Lightman *et al.* 1987), e a Ang II induzida por LH estimula a síntese local de prostaglandinas (Peterson *et al.* 1993; Yoshimura *et al.* 1993), que juntamente com os leucotrienos, a bradicinina e a histamina, induzem o processo de ruptura da parede do folículo e a extrusão do oócito maduro na ovulação (Espey 1992). Esses dados em conjunto nos levam a hipotetizar que a ausência do pico de LH na tarde do proestro nas fêmeas do grupo cafeteria, poderia estar inibindo a síntese de Ang II nos ovários e em consequência, das prostaglandinas e da ovulação. O reestabelecimento do pico pré-ovulatório de LH induzido pela administração *ip* de losartan nas fêmeas obesas em nosso estudo, poderia estar estimulando a produção de Ang II intrafolicular e o aumento das prostaglandinas e favorecendo a ovulação nas ratas submetidas à dieta da cafeteria.

Outra possível mecanismo que poderia estar mediando o reestabelecimento da ovulação induzido pelo bloqueio dos receptores AT₁ de Ang II seria um aumento da atividade da divisão simpática do sistema nervoso vegetativo, com aumento da liberação de catecolaminas, que foi observado em

camundongos com deficiência genética de Ang II (Kouyama *et al.* 2005). As catecolaminas apresentam efeito estimulatório sobre a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas em fêmeas (Anselmo-Franci *et al.* 1997). Além disso e conforme discutido no primeiro experimento, o hormônio liberador de corticotrofinas (CRH) reduz a secreção de GnRH e LH (Lanzone *et al.* 1995; Meczekalski *et al.* 2000) e a obesidade está relacionada à elevadas concentrações de corticosteróides (Boushaki *et al.* 1997). Tendo em vista que estudos demonstram que a Ang II apresenta efeito estimulatório sobre a secreção do hormônio liberador de corticotrofinas (Vale *et al.* 1983), promovendo um aumento na secreção do hormônio adrenocorticotrófico pela hipófise anterior, e em consequência de corticotrofinas (Spinedi & Negro-Vilar 1983), esse possível mecanismo poderia estar mediando o efeito positivo da administração de losartan nas fêmeas do grupo cafeteria.

Mesmo considerando uma ação positiva do losartan diretamente no ovário e/ou na secreção dos hormônios relacionados à reprodução, como na ocorrência do pico pré-ovulatório de progesterona e LH nas fêmeas obesas do grupo cafeteria, não podemos descartar a possibilidade de que esses efeitos possam ser decorrentes de uma melhora na condição fisiológica geral promovida pelo bloqueio do receptor AT₁, incluindo a ausência de acúmulo de gordura corporal, da resistência à insulina e do aumento nos níveis de colesterol e triglicerídeos nessas fêmeas na idade adulta.

Ainda, um aumento no gasto energético foi demonstrado em camundongos que apresentam deficiência genética de Ang II, com redução de peso corporal (Kouyama *et al.* 2005). A redução de peso corporal em mulheres tem sido recomendada para o reestabelecimento da função reprodutiva, prejudicada pelo aumento de gordura corporal (Kiddy *et al.* 1992; Hoeger 2001; Norman *et al.* 2002). De fato, a redução de peso corporal e do IMC em mulheres obesas promove redução na glicemia, insulinemia, HOMA, triglicerídeos e ácidos graxos livres. Ainda aumenta o HDL e reduz marcadores inflamatórios - interleucinas 6 (IL-6) e 8 (IL-8) (Esposito *et al.* 2003; Moran *et al.* 2003). Como consequência, uma redução do hiperandrogenismo e aumento na função menstrual, na ovulação e na fertilidade (Kiddy *et al.* 1992; Moran *et al.* 2003), bem como aumento nas concentrações de globulinas ligadoras de esteróides

(Guzick *et al.* 1994) são observados. Menos consistentemente documentadas são alterações nas concentrações plasmáticas do LH induzidas pela redução de gordura corporal, com estudos evidenciando reduções (Pasquali *et al.* 1989) ou nenhuma alteração (Kiddy *et al.* 1992; Guzick *et al.* 1994; Holte *et al.* 1995).

O uso terapêutico de agentes sensibilizadores à insulina como a metformina no tratamento de ovário policístico tem resultado em melhora na hiperinsulinemia e hiperandrogenismo (Nestler *et al.*, 1989; Velazquez *et al.*, 1994; Dunaif *et al.*, 1996; Nestler 1999; Pasquali 2000; Ibanez 2003) e estudos evidenciaram o reestabelecimento da ovulação em mulheres com ovário policístico que utilizaram a metformina (Ibanez *et al.* 2002; Costello & Eden 2003; Harborne *et al.* 2003; Lord *et al.* 2003). Por outro lado, um estudo recente demonstrou que a resistência à insulina não está envolvida na patogênese das alterações ovulatórias em mulheres com ovário policístico e verificou que a metformina não é efetiva para o tratamento de ov[ário policístico de mulheres com obesidade mórbida (Ehrmann *et al.*, 1997).

Interessante, apesar de não ser o objetivo de nosso estudo, constatamos em nossos resultados, excetuando-se os efeitos sobre a glicemia em resposta à administração de glicose, a ausência de efeito do bloqueio dos receptores AT₁ de Ang II sobre o acúmulo de gordura, a ingestão alimentar, a evolução do peso corporal, a resposta da insulina à injeção de glicose, e sobre as concentrações de triglicerídeos e colesteróis em animais dos grupos controles. No entanto, o losartan foi efetivo em reverter os efeitos da dieta hipercalórica sobre estes parâmetros nos animais do grupo cafeteria, o que sugere uma relação entre o acúmulo de gordura corporal e os efeitos da Ang II sobre esses parâmetros. Nesse contexto, assim como estudado e sugerido em trabalhos anteriores, há pertinência no estudo dos efeitos da Ang II na obesidade. Além disso, se considerarmos o efeito positivo da administração de losartan na ovulação e sobre o pico pré-ovulatório de LH em fêmeas obesas, e, tendo em vista a ausência de efeitos do losartan sobre esses parâmetros nas fêmeas dos grupos controles, evidenciaremos com o presente trabalho, a importância na investigação da participação da Ang II nas alterações patológicas na reprodução induzidas pela obesidade em fêmeas.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos dois experimentos desta tese permitem concluir que:

6.1. Experimento 1: Efeito da dieta da cafeteria, introduzida a partir do desmame, sobre processos reprodutivos em ratas

A dieta da cafeteria ingerida do desmame até a idade adulta, assim como descrito na literatura em humanos e animais promove acúmulo de gordura corporal, resistência à insulina e aumento nas concentrações de triglicerídeos e colesterol LDL e redução de colesterol HDL. Essas alterações promovidas pela dieta da cafeteria, juntamente com os prováveis fatores associados:

Antecipam a instalação da puberdade, conforme constatado por outros autores;

Não alteram o número de lordoses das fêmeas em relação ao número de montas dos machos;

Induzem a um aumento no tempo da fase de diestro, prolongando o ciclo reprodutivo das ratas, resultado verificado também em trabalhos prévios com mulheres obesas;

Prolonga o aumento de prolactina na tarde do proestro;

Inibem os picos pré-ovulatórios de LH e progesterona;

Reduzem o número de oócitos liberados na manhã do estro.

6.2. Experimento 2: Efeito da associação da administração de losartan com a dieta da cafeteria, introduzidos a partir do desmame, sobre processos reprodutivos em ratas

A administração de losartan, associada à dieta da cafeteria a partir do desmame, evita a ocorrência de acúmulo de gordura corporal, da resistência à insulina e do aumento nas concentrações de triglicerídeos e colesterol LDL e da redução de colesterol HDL. Além desses efeitos, o antagonismo do receptor AT₁ de Angiotensina II:

Não alteram o número de lordoses das fêmeas em relação ao número de montas dos machos;

Aumenta o tempo da fase de diestro, prolongando ainda mais o ciclo reprodutivo;

Reestabelece os picos pré-ovulatórios de LH e progesterona;

Restaura a ovulação nas fêmeas do grupo dieta da cafeteria na manhã do estro.

Em conjunto, esses dados complementam e ampliam a literatura atual com resultados que demonstram que a dieta da cafeteria introduzida precocemente e ingerida por longo período, induz obesidade e alterações metabólicas, que apresentam efeitos deletérios sobre aspectos reprodutivos, excetuando-se o comportamento sexual das fêmeas. Ainda, avançando na investigação dos mecanismos envolvidos nestes efeitos, esses achados evidenciam que a Angiotensina II, através do seu receptor AT₁ é um dos fatores mediadores das alterações reprodutivas associadas ao acúmulo de gordura corporal e às alterações metabólicas induzidos pela ingestão da dieta da cafeteria.

7. PERSPECTIVAS

1. Verificar o perfil das concentrações plasmáticas de progesterona e estradiol nas fases de estro, diestro 1 e diestro 2 do ciclo estral e de androgênios na tarde do proestro das ratas dos grupos cafeteria e cafeteria + losartan;
2. Quantificar o DNA complementar por PCR em tempo real do GnRH hipotalâmico das fêmeas dos grupos cafeteria e cafeteria + losartan;
3. Analisar as concentrações plasmáticas de Ang II ao longo do ciclo estral e as suas concentrações ovarianas na tarde do proestro nas fêmeas do grupo cafeteria;
4. Avaliar o conteúdo de Ang II em regiões hipotalâmicas envolvidas no controle da ovulação das fêmeas do grupo cafeteria.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal SK, Vogel K, Weitsman SR & Magoffin DA 1999 Leptin antagonizes the insulin-like growth factor-I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* **84** 1072-1076.
- Ahima RS, Dushay J, Flier SN, Prabakaran D & Flier JS 1997 Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin Invest* **99** 391-395.
- Ahmed ML, Ong KK, Morrell DJ, Cox L, Drayer N, Perry L, Preece MA & Dunger DB 1999 Longitudinal study of leptin concentrations during puberty: sex differences and relationship to changes in body composition. *J Clin Endocrinol Metab* **84** 899-905.
- Anselmo-Franci JA, Franci CR, Krulich L, Antunes-Rodrigues J & McCann SM 1997 Locus coeruleus lesions decrease norepinephrine input into the medial preoptic area and medial basal hypothalamus and block the LH, FSH and prolactin preovulatory surge. *Brain Res* **767** 289-296.
- Arai K, Ohshima K, Watanabe G, Arai K, Uehara K & Taya K 1998 Inhibition of ovarian follicular development associated with a decrease in luteinizing hormone levels during the estrous cycle of the rat. *Endocr J* **45** 539-546.
- Auger AP 2001 Ligand-independent activation of progesterin receptors: relevance for female sexual behaviour. *Reproduction* **122** 847-855.
- Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES & Yildiz BO 2004 The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocrinol Metab* **89** 2745-2749.
- Bajos N, Wellings K, Laborde C & Moreau C Sexuality and obesity, a gender perspective: results from French national random probability survey of sexual behaviours. *Bmj* **340** c2573.
- Baker KM, Booz GW & Dostal DE 1992 Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol* **54** 227-241.
- Bao B, Kumar N, Karp RM, Garverick HA & Sundaram K 2000 Estrogen receptor-beta expression in relation to the expression of luteinizing hormone receptor and cytochrome P450 enzymes in rat ovarian follicles. *Biol Reprod* **63** 1747-1755.
- Barker DJ 2007 Obesity and early life. *Obes Rev* **8 Suppl 1** 45-49.
- Beevers G, Lip GY & O'Brien E 2001 ABC of hypertension: The pathophysiology of hypertension. *Bmj* **322** 912-916.
- Bellver J, Rossal LP, Bosch E, Zuniga A, Corona JT, Melendez F, Gomez E, Simon C, Remohi J & Pellicer A 2003 Obesity and the risk of spontaneous abortion after oocyte donation. *Fertil Steril* **79** 1136-1140.
- Bohrer M & Kemmann E 1987 Risk factors for spontaneous abortion in menotropin-treated women. *Fertil Steril* **48** 571-575.
- Bolumar F, Olsen J, Rebagliato M, Saez-Lloret I & Bisanti L 2000 Body mass index and delayed conception: a European Multicenter Study on Infertility and Subfecundity. *Am J Epidemiol* **151** 1072-1079.
- Boushaki FZ, Rasio E & Serri O 1997 Hypothalamic-pituitary-adrenal axis in abdominal obesity: effects of dexfenfluramine. *Clin Endocrinol (Oxf)* **46** 461-466.
- Bray GA & York DA 1979 Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol Rev* **59** 719-809.
- Breigeiron MK, Morris M, Lucion AB & Sanvito GL 2002 Effects of angiotensin II microinjected into medial amygdala on male sexual behavior in rats. *Horm Behav* **41** 267-274.
- Brink M, Anwar A & Delafontaine P 2002 Neurohormonal factors in the development of catabolic/anabolic imbalance and cachexia. *Int J Cardiol* **85** 111-121, discussion 121-114.
- Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Muller-Wieland D & Kahn CR 2000 Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* **289** 2122-2125.
- Bumpus FM, Catt KJ, Chiu AT, DeGasparo M, Goodfriend T, Husain A, Peach MJ, Taylor DG, Jr. & Timmermans PB 1991 Nomenclature for angiotensin receptors. A report of the Nomenclature Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertension* **17** 720-721.

- Butcher RL, Collins WE & Fugo NW 1974 Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology* **94** 1704-1708.
- Cameron JL 1996 Nutritional determinants of puberty. *Nutr Rev* **54** S17-22.
- Carlson SH, Shelton J, White CR & Wyss JM 2000 Elevated sympathetic activity contributes to hypertension and salt sensitivity in diabetic obese Zucker rats. *Hypertension* **35** 403-408.
- Carrell DT, Jones KP, Peterson CM, Aoki V, Emery BR & Campbell BR 2001 Body mass index is inversely related to intrafollicular HCG concentrations, embryo quality and IVF outcome. *Reprod Biomed Online* **3** 109-111.
- Cassis LA, English VL, Bharadwaj K & Boustany CM 2004 Differential effects of local versus systemic angiotensin II in the regulation of leptin release from adipocytes. *Endocrinology* **145** 169-174.
- Cassis LA, Marshall DE, Fettinger MJ, Rosenbluth B & Lodder RA 1998 Mechanisms contributing to angiotensin II regulation of body weight. *Am J Physiol* **274** E867-876.
- Cecconello AL, Raineki C, Sebben V, Lucion AB & Sanvito GL Effect of acute stress on sexual behavior in female rats: participation of the central angiotensinergic system. *Behav Brain Res* **207** 429-433.
- Chan P, Liu JC, Tong YC, Chen YJ, Wang CC, Tomlinson B & Cheng JT 1999 Effects of losartan on the sexual behavior of male rats. *Pharmacology* **58** 132-139.
- Chehab FF, Mounzih K, Lu R & Lim ME 1997 Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science* **275** 88-90.
- Cheung CC, Thornton JE, Kuijper JL, Weigle DS, Clifton DK & Steiner RA 1997 Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology* **138** 855-858.
- Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, Ardecky RJ, Carini DJ, Duncia JV, Pease LJ, Wong PC, Wexler RR, Johnson AL & et al. 1989 Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* **165** 196-203.
- Chopra M, Galbraith S & Darnton-Hill I 2002 A global response to a global problem: the epidemic of overnutrition. *Bull World Health Organ* **80** 952-958.
- Chrousos GP, Torpy DJ & Gold PW 1998 Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. *Ann Intern Med* **129** 229-240.
- Clark JT 1989 A possible role for angiotensin II in the regulation of male sexual behavior in rats. *Physiol Behav* **45** 221-224.
- Clayton RN & Catt KJ 1981 Gonadotropin-releasing hormone receptors: characterization, physiological regulation, and relationship to reproductive function. *Endocr Rev* **2** 186-209.
- Coatmellec-Taglioni G, Dausse JP, Giudicelli Y & Ribiere C 2002 Gender difference in diet-induced obesity hypertension: implication of renal alpha2-adrenergic receptors. *Am J Hypertens* **15** 143-149.
- Coolen LM, Peters HJ & Veening JG 1996 Fos immunoreactivity in the rat brain following consummatory elements of sexual behavior: a sex comparison. *Brain Res* **738** 67-82.
- Costello MF & Eden JA 2003 A systematic review of the reproductive system effects of metformin in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* **79** 1-13.
- Culman J, von Heyer C, Piepenburg B, Rascher W & Unger T 1999 Effects of systemic treatment with irbesartan and losartan on central responses to angiotensin II in conscious, normotensive rats. *Eur J Pharmacol* **367** 255-265.
- Dahlof B, Zanchetti A, Diez J, Nicholls MG, Yu CM, Barrios V, Aurup P, Smith RD & Johansson M 2002 Effects of losartan and atenolol on left ventricular mass and neurohormonal profile in patients with essential hypertension and left ventricular hypertrophy. *J Hypertens* **20** 1855-1864.
- Dameto MC, Rayo JM, Esteban S, Prieto RM & Tur JA 1994 Effect of cafeteria diet on alpha-MG intestinal absorption in rats. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol* **108** 467-470.
- Daud AI, Bumpus FM & Husain A 1988 Evidence for selective expression of angiotensin II receptors on atretic follicles in the rat ovary: an autoradiographic study. *Endocrinology* **122** 2727-2734.
- Dawson R, Pellemounter MA, Millard WJ, Liu S & Eppler B 1997 Attenuation of leptin-mediated effects by monosodium glutamate-induced arcuate nucleus damage. *Am J Physiol* **273** E202-206.

- de Gooyer TE, Skinner SL, Wlodek ME, Kelly DJ & Wilkinson-Berka JL 2004 Angiotensin II influences ovarian follicle development in the transgenic (mRen-2)²⁷ and Sprague-Dawley rat. *J Endocrinol* **180** 311-324.
- De Pergola G, Maldera S, Tartagni M, Pannacciulli N, Loverro G & Giorgino R 2006 Inhibitory effect of obesity on gonadotropin, estradiol, and inhibin B levels in fertile women. *Obesity (Silver Spring)* **14** 1954-1960.
- DeFronzo RA & Ferrannini E 1991 Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* **14** 173-194.
- Deitel M 2003 Overweight and obesity worldwide now estimated to involve 1.7 billion people. *Obes Surg* **13** 329-330.
- Dietz WH 1994 Critical periods in childhood for the development of obesity. *Am J Clin Nutr* **59** 955-959.
- Dolnikoff MS, Kater CE, Egami M, de Andrade IS & Marmo MR 1988 Neonatal treatment with monosodium glutamate increases plasma corticosterone in the rat. *Neuroendocrinology* **48** 645-649.
- Donadio MV, Kunrath A, Corezola KL, Franci CR, Anselmo-Franci JA, Lucion AB & Sanvito GL 2007 Effects of acute stress on the day of proestrus on sexual behavior and ovulation in female rats: participation of the angiotensinergic system. *Physiol Behav* **92** 591-600.
- Duggal PS, Van Der Hoek KH, Milner CR, Ryan NK, Armstrong DT, Magoffin DA & Norman RJ 2000 The in vivo and in vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat. *Endocrinology* **141** 1971-1976.
- Ellingsen E & Agmo A 2004 Sexual-incentive motivation and paced sexual behavior in female rats after treatment with drugs modifying dopaminergic neurotransmission. *Pharmacol Biochem Behav* **77** 431-445.
- Engeli S, Bohnke J, Gorzelniak K, Janke J, Schling P, Bader M, Luft FC & Sharma AM 2005 Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Hypertension* **45** 356-362.
- Engeli S, Gorzelniak K, Kreutz R, Runkel N, Distler A & Sharma AM 1999 Co-expression of renin-angiotensin system genes in human adipose tissue. *J Hypertens* **17** 555-560.
- Engeli S, Negrel R & Sharma AM 2000 Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension* **35** 1270-1277.
- Engeli S, Schling P, Gorzelniak K, Boschmann M, Janke J, Ailhaud G, Teboul M, Massiera F & Sharma AM 2003 The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *Int J Biochem Cell Biol* **35** 807-825.
- Espey LL 1992 A review of factors that could influence membrane potentials of ovarian follicular cells during mammalian ovulation. *Acta Endocrinol (Copenh)* **126 Suppl 2** 1-31.
- Esposito K, Pontillo A, Di Palo C, Giugliano G, Masella M, Marfella R & Giugliano D 2003 Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *Jama* **289** 1799-1804.
- Farooqi IS, Keogh JM, Kamath S, Jones S, Gibson WT, Trussell R, Jebb SA, Lip GY & O'Rahilly S 2001 Partial leptin deficiency and human adiposity. *Nature* **414** 34-35.
- Fedoresak P, Dale PO, Storeng R, Tanbo T & Abyholm T 2001 The impact of obesity and insulin resistance on the outcome of IVF or ICSI in women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* **16** 1086-1091.
- Ferrario CM & Levy P 2002 Sexual dysfunction in patients with hypertension: implications for therapy. *J Clin Hypertens (Greenwich)* **4** 424-432.
- Fitzsimons JT 1980 Angiotensin in the control of water and sodium intake. *Soc Gen Physiol Ser* **35** 99-106.
- Flanagan-Cato LM, Calizo LH & Daniels D 2001 The synaptic organization of VMH neurons that mediate the effects of estrogen on sexual behavior. *Horm Behav* **40** 178-182.
- Fogari R, Preti P, Zoppi A, Corradi L, Pasotti C, Rinaldi A & Mugellini A 2004 Effect of valsartan and atenolol on sexual behavior in hypertensive postmenopausal women. *Am J Hypertens* **17** 77-81.
- Freeman ME 1994 In: *The ovarian cycle of the rat.*, pp. New York: Knobil & Neill.

- Fregly MJ & Rowland NE 1991 Effect of a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, DuP 753, on angiotensin-related water intake in rats. *Brain Res Bull* **27** 97-100.
- Fridstrom M, Nisell H, Sjoblom P & Hillensjo T 1999 Are women with polycystic ovary syndrome at an increased risk of pregnancy-induced hypertension and/or preeclampsia? *Hypertens Pregnancy* **18** 73-80.
- Friedman CI & Kim MH 1985 Obesity and its effect on reproductive function. *Clin Obstet Gynecol* **28** 645-663.
- Frisch RE 1987 Body fat, menarche, fitness and fertility. *Hum Reprod* **2** 521-533.
- Frisch RE, Hegsted DM & Yoshinaga K 1975 Body weight and food intake at early estrus of rats on a high-fat diet. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72** 4172-4176.
- Frisch RE & McArthur JW 1974 Menstrual cycles: fatness as a determinant of minimum weight for height necessary for their maintenance or onset. *Science* **185** 949-951.
- Fukuda N, Satoh C, Hu WY, Nakayama M, Kishioka H & Kanmatsuse K 2001 Endogenous angiotensin II suppresses insulin signaling in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* **19** 1651-1658.
- Galtier-Dereure F, Boegner C & Bringer J 2000 Obesity and pregnancy: complications and cost. *Am J Clin Nutr* **71** 1242S-1248S.
- Gambineri A, Pelusi C, Vicennati V, Pagotto U & Pasquali R 2002 Obesity and the polycystic ovary syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* **26** 883-896.
- Garcia-Mayor RV, Andrade MA, Rios M, Lage M, Dieguez C & Casanueva FF 1997 Serum leptin levels in normal children: relationship to age, gender, body mass index, pituitary-gonadal hormones, and pubertal stage. *J Clin Endocrinol Metab* **82** 2849-2855.
- Giacchetti G, Faloia E, Mariniello B, Sardu C, Gatti C, Camilloni MA, Guerrieri M & Mantero F 2002 Overexpression of the renin-angiotensin system in human visceral adipose tissue in normal and overweight subjects. *Am J Hypertens* **15** 381-388.
- Glick Z, Yamini S, Lupien J & Sod-Moriah U 1990 Estrous cycle irregularities in overfed rats. *Physiol Behav* **47** 307-310.
- Gogia A & Agarwal PK 2006 Metabolic syndrome. *Indian J Med Sci* **60** 72-81.
- Golden NH & Shenker IR 1994 Amenorrhea in anorexia nervosa. Neuroendocrine control of hypothalamic dysfunction. *Int J Eat Disord* **16** 53-60.
- Gomes CM, Frantz PJ, Sanvito GL, Anselmo-Franci JA & Lucion AB 1999 Neonatal handling induces anovulatory estrous cycles in rats. *Braz J Med Biol Res* **32** 1239-1242.
- Goodfriend TL, Kelley DE, Goodpaster BH & Winters SJ 1999 Visceral obesity and insulin resistance are associated with plasma aldosterone levels in women. *Obes Res* **7** 355-362.
- Goossens GH, Blaak EE & van Baak MA 2003 Possible involvement of the adipose tissue renin-angiotensin system in the pathophysiology of obesity and obesity-related disorders. *Obes Rev* **4** 43-55.
- Grenman S, Ronnema T, Irjala K, Kaihola HL & Gronroos M 1986 Sex steroid, gonadotropin, cortisol, and prolactin levels in healthy, massively obese women: correlation with abdominal fat cell size and effect of weight reduction. *J Clin Endocrinol Metab* **63** 1257-1261.
- Gruaz NM, Lalaoui M, Pierroz DD, Englaro P, Sizonenko PC, Blum WF & Aubert ML 1998 Chronic administration of leptin into the lateral ventricle induces sexual maturation in severely food-restricted female rats. *J Neuroendocrinol* **10** 627-633.
- Grundy SM 1999 Hypertriglyceridemia, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *Am J Cardiol* **83** 25F-29F.
- Guzick DS, Wing R, Smith D, Berga SL & Winters SJ 1994 Endocrine consequences of weight loss in obese, hyperandrogenic, anovulatory women. *Fertil Steril* **61** 598-604.
- Hall LF & Neubert AG 2005 Obesity and pregnancy. *Obstet Gynecol Surv* **60** 253-260.
- Harborne L, Fleming R, Lyall H, Norman J & Sattar N 2003 Descriptive review of the evidence for the use of metformin in polycystic ovary syndrome. *Lancet* **361** 1894-1901.
- Harms PG & Ojeda SR 1974 A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. *J Appl Physiol* **36** 391-392.

- Hartz AJ,Barboriak PN,Wong A,Katayama KP & Rimm AA 1979 The association of obesity with infertility and related menstrual abnormalities in women. *Int J Obes* **3** 57-73.
- Helmreich DL & Cameron JL 1992 Suppression of luteinizing hormone secretion during food restriction in male rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): failure of naloxone to restore normal pulsatility. *Neuroendocrinology* **56** 464-473.
- Herbison AE 1998 Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev* **19** 302-330.
- Herman-Giddens ME,Kaplowitz PB & Wasserman R 2004 Navigating the recent articles on girls' puberty in Pediatrics: what do we know and where do we go from here? *Pediatrics* **113** 911-917.
- Hill JO & Peters JC 1998 Environmental contributions to the obesity epidemic. *Science* **280** 1371-1374.
- Himms-Hagen J,Triandafillou J & Gwilliam C 1981 Brown adipose tissue of cafeteria-fed rats. *Am J Physiol* **241** E116-120.
- Hoeger K 2001 Obesity and weight loss in polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol Clin North Am* **28** 85-97, vi-vii.
- Hoенack C & Roesen P 1996 Inhibition of angiotensin type 1 receptor prevents decline of glucose transporter (GLUT4) in diabetic rat heart. *Diabetes* **45 Suppl 1** S82-87.
- Hollenberg NK 1992 Treatment of hypertension: the place of angiotensin-converting enzyme inhibitors in the nineties. *J Cardiovasc Pharmacol* **20 Suppl 10** S29-32.
- Holte J,Bergh T,Berne C,Wide L & Lithell H 1995 Restored insulin sensitivity but persistently increased early insulin secretion after weight loss in obese women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **80** 2586-2593.
- Hotamisligil GS,Shargill NS & Spiegelman BM 1993 Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **259** 87-91.
- Hotchkiss J; Knobil E 1994 In: *The menstrual cycle and its neuroendocrine control.*, pp.New York: Knobil & Neill.
- Husain A,Bumpus FM,De Silva P & Speth RC 1987 Localization of angiotensin II receptors in ovarian follicles and the identification of angiotensin II in rat ovaries. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** 2489-2493.
- Ibanez L,Potau N,Ferrer A,Rodriguez-Hierro F,Marcos MV & De Zegher F 2002 Anovulation in eumenorrheic, nonobese adolescent girls born small for gestational age: insulin sensitization induces ovulation, increases lean body mass, and reduces abdominal fat excess, dyslipidemia, and subclinical hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* **87** 5702-5705.
- Ibanez L,Potau N,Francois I & de Zegher F 1998 Precocious pubarche, hyperinsulinism, and ovarian hyperandrogenism in girls: relation to reduced fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab* **83** 3558-3562.
- Innami S,Yang MG,Mickelsen O & Hafs HD 1973 The influence of high-fat diets on estrous cycles, sperm production and fertility of rats. *Proc Soc Exp Biol Med* **143** 63-68.
- Jahns L,Siega-Riz AM & Popkin BM 2001 The increasing prevalence of snacking among US children from 1977 to 1996. *J Pediatr* **138** 493-498.
- Jain A,Polotsky AJ,Rochester D,Berga SL,Loucks T,Zeitlian G,Gibbs K,Polotsky HN,Feng S,Isaac B & Santoro N 2007 Pulsatile luteinizing hormone amplitude and progesterone metabolite excretion are reduced in obese women. *J Clin Endocrinol Metab* **92** 2468-2473.
- Janke J,Engeli S,Gorzelnik K,Luft FC & Sharma AM 2002 Mature adipocytes inhibit in vitro differentiation of human preadipocytes via angiotensin type 1 receptors. *Diabetes* **51** 1699-1707.
- Jarry H,Leonhardt S & Wuttke W 1993 Laterality of the gonadotrophin releasing hormone pulse generator in the rat: interaction of neurons located in both preoptic areas as a basic feature. *Hum Reprod* **8 Suppl 2** 7-12.
- Johren O,Imboden H,Hauser W,Maye I,Sanvitto GL & Saavedra JM 1997 Localization of angiotensin-converting enzyme, angiotensin II, angiotensin II receptor subtypes, and vasopressin in the mouse hypothalamus. *Brain Res* **757** 218-227.
- Jones BH,Standridge MK,Taylor JW & Moustaid N 1997 Angiotensinogen gene expression in adipose tissue: analysis of obese models and hormonal and nutritional control. *Am J Physiol* **273** R236-242.

- Julius S, Kjeldsen SE, Weber M, Brunner HR, Ekman S, Hansson L, Hua T, Laragh J, McInnes GT, Mitchell L, Plat F, Schork A, Smith B & Zanchetti A 2004 Outcomes in hypertensive patients at high cardiovascular risk treated with regimens based on valsartan or amlodipine: the VALUE randomised trial. *Lancet* **363** 2022-2031.
- Kaaks R, Lukanova A & Kurzer MS 2002 Obesity, endogenous hormones, and endometrial cancer risk: a synthetic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11** 1531-1543.
- Kalra PS, Dube MG, Xu B, Farmerie WG & Kalra SP 1998 Neuropeptide Y (NPY) Y1 receptor mRNA is upregulated in association with transient hyperphagia and body weight gain: evidence for a hypothalamic site for concurrent development of leptin resistance. *J Neuroendocrinol* **10** 43-49.
- Karkanas GB, Morales JC & Li CS 1997 Deficits in reproductive behavior in diabetic female rats are due to hypoinsulinemia rather than hyperglycemia. *Horm Behav* **32** 19-29.
- Kaynard AH, Malpoux B, Robinson JE, Wayne NL & Karsch FJ 1988 Importance of pituitary and neural actions of estradiol in induction of the luteinizing hormone surge in the ewe. *Neuroendocrinology* **48** 296-303.
- Keaton AK & Clark JT 1998 Effects of angiotensin II on sexual function, blood pressure, and fluid intake are differentially affected by AT-1 receptor blockade. *Physiol Behav* **64** 339-346.
- Kennedy GC & Mitra J 1963 Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat. *J Physiol* **166** 408-418.
- Kiddy DS, Hamilton-Fairley D, Bush A, Short F, Anyaoku V, Reed MJ & Franks S 1992 Improvement in endocrine and ovarian function during dietary treatment of obese women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* **36** 105-111.
- Kirschner MA, Schneider G, Ertel NH & Worton E 1982 Obesity, androgens, estrogens, and cancer risk. *Cancer Res* **42** 3281s-3285s.
- Kjeldsen SE, Julius S, Mancia G, McInnes GT, Hua T, Weber MA, Coca A, Ekman S, Girerd X, Jamerson K, Laroche P, MacDonald TM, Schmieder RE, Schork MA, Stolt P, Viskoper R, Widimsky J & Zanchetti A 2006 Effects of valsartan compared to amlodipine on preventing type 2 diabetes in high-risk hypertensive patients: the VALUE trial. *J Hypertens* **24** 1405-1412.
- Koloszar S, Daru J, Kereszturi A, Zavaczki Z, Szollosi J & Pal A 2002 Effect of female body weight on efficiency of donor AI. *Arch Androl* **48** 323-327.
- Kolotkin RL, Binks M, Crosby RD, Ostbye T, Gress RE & Adams TD 2006 Obesity and sexual quality of life. *Obesity (Silver Spring)* **14** 472-479.
- Kouyama R, Suganami T, Nishida J, Tanaka M, Toyoda T, Kiso M, Chiwata T, Miyamoto Y, Yoshimasa Y, Fukamizu A, Horiuchi M, Hirata Y & Ogawa Y 2005 Attenuation of diet-induced weight gain and adiposity through increased energy expenditure in mice lacking angiotensin II type 1a receptor. *Endocrinology* **146** 3481-3489.
- Kretschmer BD, Schelling P, Beier N, Liebscher C, Treutel S, Kruger N, Scholz HP & Haus A 2005 Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. *Life Sci* **76** 1553-1573.
- Kurtz TW & Pravenec M 2004 Antidiabetic mechanisms of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonists: beyond the renin-angiotensin system. *J Hypertens* **22** 2253-2261.
- Lake JK, Power C & Cole TJ 1997 Child to adult body mass index in the 1958 British birth cohort: associations with parental obesity. *Arch Dis Child* **77** 376-381.
- Lamarche B, Tchernof A, Moorjani S, Cantin B, Dagenais GR, Lupien PJ & Despres JP 1997 Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men. Prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Circulation* **95** 69-75.
- Landrigan P, Garg A & Droller DB 2003 Assessing the effects of endocrine disruptors in the National Children's Study. *Environ Health Perspect* **111** 1678-1682.
- Lanzone A, Petraglia F, Fulghesu AM, Ciampelli M, Caruso A & Mancuso S 1995 Corticotropin-releasing hormone induces an exaggerated response of adrenocorticotrophic hormone and cortisol in polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* **63** 1195-1199.

- Lastra G, Manrique C, McFarlane SI & Sowers JR 2006 Cardiometabolic syndrome and chronic kidney disease. *Curr Diab Rep* **6** 207-212.
- Lau T, Carlsson PO & Leung PS 2004 Evidence for a local angiotensin-generating system and dose-dependent inhibition of glucose-stimulated insulin release by angiotensin II in isolated pancreatic islets. *Diabetologia* **47** 240-248.
- Lee DM, Kiener HP, Agarwal SK, Noss EH, Watts GF, Chisaka O, Takeichi M & Brenner MB 2007 Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. *Science* **315** 1006-1010.
- Levi JE & Weinberg T 1949 Pregnancy in alloxan diabetic rats. *Proc Soc Exp Biol Med* **72** 658-662.
- Levine JE 1997 New concepts of the neuroendocrine regulation of gonadotropin surges in rats. *Biol Reprod* **56** 293-302.
- Li Z, Bains JS & Ferguson AV 1993 Functional evidence that the angiotensin antagonist losartan crosses the blood-brain barrier in the rat. *Brain Res Bull* **30** 33-39.
- Licata G, Scaglione R, Ganguzza A, Corrao S, Donatelli M, Parrinello G, Dichiaro MA, Merlino G & Cecala MG 1994 Central obesity and hypertension. Relationship between fasting serum insulin, plasma renin activity, and diastolic blood pressure in young obese subjects. *Am J Hypertens* **7** 314-320.
- Lightman A, Tarlatzis BC, Rzasz PJ, Culler MD, Caride VJ, Negro-Vilar AF, Lennard D, DeCherney AH & Naftolin F 1987 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* **156** 808-816.
- Lintsen AM, Pasker-de Jong PC, de Boer EJ, Burger CW, Jansen CA, Braat DD & van Leeuwen FE 2005 Effects of subfertility cause, smoking and body weight on the success rate of IVF. *Hum Reprod* **20** 1867-1875.
- Lithell H, Hansson L, Skoog I, Elmfeldt D, Hofman A, Olofsson B, Trenkwalder P & Zanchetti A 2003 The Study on Cognition and Prognosis in the Elderly (SCOPE): principal results of a randomized double-blind intervention trial. *J Hypertens* **21** 875-886.
- Llado I, Pico C, Palou A & Pons A 1995 Protein and amino acid intake in cafeteria fed obese rats. *Physiol Behav* **58** 513-519.
- Longcope C, Kato T & Horton R 1969 Conversion of blood androgens to estrogens in normal adult men and women. *J Clin Invest* **48** 2191-2201.
- Loos RJ & Bouchard C 2003 Obesity--is it a genetic disorder? *J Intern Med* **254** 401-425.
- Lord JM, Flight IH & Norman RJ 2003 Metformin in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *Bmj* **327** 951-953.
- Loveland JB, McClamrock HD, Malinow AM & Sharara FI 2001 Increased body mass index has a deleterious effect on in vitro fertilization outcome. *J Assist Reprod Genet* **18** 382-386.
- Machado LJ, Marubayashi U, Reis AM & Coimbra CC 1998 The hyperglycemia induced by angiotensin II in rats is mediated by AT1 receptors. *Braz J Med Biol Res* **31** 1349-1352.
- Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S & et al. 1995 Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* **1** 1155-1161.
- Martins MR, Vieira AK, de Souza EP & Moura AS 2008 Early overnutrition impairs insulin signaling in the heart of adult Swiss mice. *J Endocrinol* **198** 591-598.
- Massiera F, Seydoux J, Geloën A, Quignard-Boulange A, Turban S, Saint-Marc P, Fukamizu A, Negrel R, Ailhaud G & Teboul M 2001 Angiotensinogen-deficient mice exhibit impairment of diet-induced weight gain with alteration in adipose tissue development and increased locomotor activity. *Endocrinology* **142** 5220-5225.
- Mathews D & Edwards DA 1977 Involvement of the ventromedial and anterior hypothalamic nuclei in the hormonal induction of receptivity in the female rat. *Physiol Behav* **19** 319-326.
- McKinley MJ, McAllen RM, Pennington GL, Smardencas A, Weisinger RS & Oldfield BJ 1996 Physiological actions of angiotensin II mediated by AT1 and AT2 receptors in the brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* **3** S99-104.

- Meczekalski B, Tonetti A, Monteleone P, Bernardi F, Luisi S, Stomati M, Luisi M, Petraglia F & Genazzani AR 2000 Hypothalamic amenorrhea with normal body weight: ACTH, allopregnanolone and cortisol responses to corticotropin-releasing hormone test. *Eur J Endocrinol* **142** 280-285.
- Micevych P, Sinchak K, Mills RH, Tao L, LaPolt P & Lu JK 2003 The luteinizing hormone surge is preceded by an estrogen-induced increase of hypothalamic progesterone in ovariectomized and adrenalectomized rats. *Neuroendocrinology* **78** 29-35.
- Michlin R, Oettinger M, Odeh M, Khoury S, Ophir E, Barak M, Wolfson M & Strulov A 2000 Maternal obesity and pregnancy outcome. *Isr Med Assoc J* **2** 10-13.
- Mihessen-Neto I, Reis AM, Marubayashi U & Coimbra CC 1996 Effect of sympathoadrenal blockade on the hyperglycemic action of angiotensin II. *Neuropeptides* **30** 303-308.
- Miller J, Rosenbloom A & Silverstein J 2004 Childhood obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **89** 4211-4218.
- Mitchell GW, Jr. & Rogers J 1953 The influence of weight reduction on amenorrhea in obese women. *N Engl J Med* **249** 835-837.
- Moenter SM, Caraty A & Karsch FJ 1990 The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Endocrinology* **127** 1375-1384.
- Moran LJ, Noakes M, Clifton PM, Tomlinson L, Galletly C & Norman RJ 2003 Dietary composition in restoring reproductive and metabolic physiology in overweight women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **88** 812-819.
- Moret C, Isaac M & Briley M 2009 Problems associated with long-term treatment with selective serotonin reuptake inhibitors. *J Psychopharmacol* **23** 967-974.
- Mothe I & Van Obberghen E 1996 Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on multiple serine residues, 612, 632, 662, and 731, modulates insulin action. *J Biol Chem* **271** 11222-11227.
- Muhlhauser B & Smith SR 2009 Early-life origins of metabolic dysfunction: role of the adipocyte. *Trends Endocrinol Metab* **20** 51-57.
- Mundy AL, Haas E, Bhattacharya I, Widmer CC, Kretz M, Hofmann-Lehmann R, Minotti R & Barton M 2007 Fat intake modifies vascular responsiveness and receptor expression of vasoconstrictors: implications for diet-induced obesity. *Cardiovasc Res* **73** 368-375.
- Nakamura T, Tokunaga K, Shimomura I, Nishida M, Yoshida S, Kotani K, Islam AH, Keno Y, Kobatake T, Nagai Y & et al. 1994 Contribution of visceral fat accumulation to the development of coronary artery disease in non-obese men. *Atherosclerosis* **107** 239-246.
- Nomura M, Nishii H, Ozaki Y, Fujimoto N & Matsumoto T 2007 An angiotensin II receptor blocker increases sexual behavior in type 2 diabetic mice. *Physiol Behav* **91** 223-228.
- Norman RJ & Clark AM 1998 Obesity and reproductive disorders: a review. *Reprod Fertil Dev* **10** 55-63.
- Norman RJ, Davies MJ, Lord J & Moran LJ 2002 The role of lifestyle modification in polycystic ovary syndrome. *Trends Endocrinol Metab* **13** 251-257.
- Ogden CL, Flegal KM, Carroll MD & Johnson CL 2002 Prevalence and trends in overweight among US children and adolescents, 1999-2000. *Jama* **288** 1728-1732.
- Ogden CL, Yanovski SZ, Carroll MD & Flegal KM 2007 The epidemiology of obesity. *Gastroenterology* **132** 2087-2102.
- Ojeda SR, Advis JP & Andrews WW 1980 Neuroendocrine control of the onset of puberty in the rat. *Fed Proc* **39** 2365-2371.
- Olshansky SJ, Passaro DJ, Hershow RC, Layden J, Carnes BA, Brody J, Hayflick L, Butler RN, Allison DB & Ludwig DS 2005 A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. *N Engl J Med* **352** 1138-1145.
- Parent AS, Teilmann G, Juul A, Skakkebaek NE, Toppari J & Bourguignon JP 2003 The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocr Rev* **24** 668-693.
- Pasquali R, Antenucci D, Casimirri F, Venturoli S, Paradisi R, Fabbri R, Balestra V, Melchionda N & Barbara L 1989 Clinical and hormonal characteristics of obese amenorrheic hyperandrogenic women before and after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* **68** 173-179.

- Pasquali R, Casimirri F, Cantobelli S, Labate AM, Venturoli S, Paradisi R & Zannarini L 1993 Insulin and androgen relationships with abdominal body fat distribution in women with and without hyperandrogenism. *Horm Res* **39** 179-187.
- Pasquali R, Vicennati V, Cacciari M & Pagotto U 2006 The hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in obesity and the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* **1083** 111-128.
- Pedersen EB, Danielsen H, Jensen T, Madsen M, Sorensen SS & Thomsen OO 1986 Angiotensin II, aldosterone and arginine vasopressin in plasma in congestive heart failure. *Eur J Clin Invest* **16** 56-60.
- Peterson CM, Morioka N, Zhu C, Ryan JW & LeMaire WJ 1993 Angiotensin-converting enzyme inhibitors have no effect on ovulation and ovarian steroidogenesis in the perfused rat ovary. *Reprod Toxicol* **7** 131-135.
- Pettigrew R & Hamilton-Fairley D 1997 Obesity and female reproductive function. *Br Med Bull* **53** 341-358.
- Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Held P, McMurray JJ, Michelson EL, Olofsson B, Ostergren J, Yusuf S & Pocock S 2003 Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-Overall programme. *Lancet* **362** 759-766.
- Phillips MS, Liu Q, Hammond HA, Dugan V, Hey PJ, Caskey CJ & Hess JF 1996 Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat Genet* **13** 18-19.
- Pi-Sunyer FX 2002 The obesity epidemic: pathophysiology and consequences of obesity. *Obes Res* **10 Suppl 2** 97S-104S.
- Pleim ET, Brown TJ, MacLusky NJ, Etgen AM & Barfield RJ 1989 Dilute estradiol implants and progesterone receptor induction in the ventromedial nucleus of the hypothalamus: correlation with receptive behavior in female rats. *Endocrinology* **124** 1807-1812.
- Poletini MO, Szawka RE, Freitas Marcon RM, Veiga MD, Franci CR & Anselmo-Franci JA 2003 A method to study preovulatory surges of gonadotropins. *Brain Res Brain Res Protoc* **12** 41-48.
- Polidori C, Ciccocioppo R, De Caro G & Massi M 1998 Further evidence that central tachykinin NK-1 receptors mediate the inhibitory effect of tachykinins on angiotensin-induced drinking in rats. *Peptides* **19** 149-155.
- Polidori C, Ciccocioppo R, Pompei P, Cirillo R & Massi M 1996 Functional evidence for the ability of angiotensin AT1 receptor antagonists to cross the blood-brain barrier in rats. *Eur J Pharmacol* **307** 259-267.
- Poretsky L, Cataldo NA, Rosenwaks Z & Giudice LC 1999 The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocr Rev* **20** 535-582.
- Porter JP, Anderson JM, Robison RJ & Phillips AC 2003 Effect of central angiotensin II on body weight gain in young rats. *Brain Res* **959** 20-28.
- Porter JP & Potratz KR 2004 Effect of intracerebroventricular angiotensin II on body weight and food intake in adult rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287** R422-428.
- Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, Corezola do Amaral ME, Hoer NF, Boschero AC & Saad MJ 2005 Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology* **146** 1576-1587.
- Prats E, Monfar M, Castella J, Iglesias R & Alemany M 1989 Energy intake of rats fed a cafeteria diet. *Physiol Behav* **45** 263-272.
- Rajendren G & Moss RL 1993 The role of the medial nucleus of amygdala in the mating-induced enhancement of lordosis in female rats: the interaction with luteinizing hormone-releasing hormone neuronal system. *Brain Res* **617** 81-86.
- Rajkhowa M, Neary RH, Kumpatla P, Game FL, Jones PW, Obhrai MS & Clayton RN 1997 Altered composition of high density lipoproteins in women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **82** 3389-3394.
- Re RN 1989 The cellular biology of angiotensin: paracrine, autocrine and intracrine actions in cardiovascular tissues. *J Mol Cell Cardiol* **21 Suppl 5** 63-69.

- Reiter EO, Kaplan SL, Conte FA & Grumbach MM 1975 Responsivity of pituitary gonadotropes to luteinizing hormone-releasing factor in idiopathic precocious puberty, precocious thelarche, precocious adrenarche, and in patients treated with medroxyprogesterone acetate. *Pediatr Res* **9** 111-116.
- Rhodes ME, Balestreire EM, Czambel RK & Rubin RT 2002 Estrous cycle influences on sexual diergism of HPA axis responses to cholinergic stimulation in rats. *Brain Res Bull* **59** 217-225.
- Rich-Edwards JW, Spiegelman D, Garland M, Hertzmark E, Hunter DJ, Colditz GA, Willett WC, Wand H & Manson JE 2002 Physical activity, body mass index, and ovulatory disorder infertility. *Epidemiology* **13** 184-190.
- Rincon-Choles H, Kasinath BS, Gorin Y & Abboud HE 2002 Angiotensin II and growth factors in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* S8-11.
- Rittmaster RS, Deshwal N & Lehman L 1993 The role of adrenal hyperandrogenism, insulin resistance, and obesity in the pathogenesis of polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **76** 1295-1300.
- Rivest S & Rivier C 1995 The role of corticotropin-releasing factor and interleukin-1 in the regulation of neurons controlling reproductive functions. *Endocr Rev* **16** 177-199.
- Rothwell NJ & Stock MJ 1979 A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature* **281** 31-35.
- Ryo M, Nakamura T, Kihara S, Kumada M, Shibazaki S, Takahashi M, Nagai M, Matsuzawa Y & Funahashi T 2004 Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circ J* **68** 975-981.
- Saavedra JM 1992 Brain and pituitary angiotensin. *Endocr Rev* **13** 329-380.
- Saiki A, Ohira M, Endo K, Koide N, Oyama T, Murano T, Watanabe H, Miyashita Y & Shirai K 2009 Circulating angiotensin II is associated with body fat accumulation and insulin resistance in obese subjects with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* **58** 708-713.
- Santoro N, Lasley B, McConnell D, Allsworth J, Crawford S, Gold EB, Finkelstein JS, Greendale GA, Kelsey J, Korenman S, Luborsky JL, Matthews K, Midgley R, Powell L, Sabatine J, Schocken M, Sowers MF & Weiss G 2004 Body size and ethnicity are associated with menstrual cycle alterations in women in the early menopausal transition: The Study of Women's Health across the Nation (SWAN) Daily Hormone Study. *J Clin Endocrinol Metab* **89** 2622-2631.
- Sanvitto GL, Johren O, Hauser W & Saavedra JM 1997 Water deprivation upregulates ANG II AT1 binding and mRNA in rat subfornical organ and anterior pituitary. *Am J Physiol* **273** E156-163.
- Sclafani A & Springer D 1976 Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiol Behav* **17** 461-471.
- Segal MM, Bell J & Abrams GM 1991 Hypothalamic or central obesity is associated with an early rise in plasma insulin concentration. *Arch Neurol* **48** 429-431.
- Sepilian V & Nagamani M 2005 Effects of rosiglitazone in obese women with polycystic ovary syndrome and severe insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* **90** 60-65.
- Shafat A, Murray B & Rumsey D 2009 Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat. *Appetite* **52** 34-38.
- Sharma AM, Janke J, Gorzelniak K, Engeli S & Luft FC 2002 Angiotensin blockade prevents type 2 diabetes by formation of fat cells. *Hypertension* **40** 609-611.
- Shaw MA, Rasmussen KM & Myers TR 1997 Consumption of a high fat diet impairs reproductive performance in Sprague-Dawley rats. *J Nutr* **127** 64-69.
- Shenoy U & Cassis L 1997 Characterization of renin activity in brown adipose tissue. *Am J Physiol* **272** C989-999.
- Sherman BM & Korenman SG 1974 Measurement of plasma LH, FSH, estradiol and progesterone in disorders of the human menstrual cycle: the short luteal phase. *J Clin Endocrinol Metab* **38** 89-93.
- Shimabukuro M, Higa M, Zhou YT, Wang MY, Newgard CB & Unger RH 1998 Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. Role of serine palmitoyltransferase overexpression. *J Biol Chem* **273** 32487-32490.

- Shiuchi T, Iwai M, Li HS, Wu L, Min LJ, Li JM, Okumura M, Cui TX & Horiuchi M 2004 Angiotensin II type-1 receptor blocker valsartan enhances insulin sensitivity in skeletal muscles of diabetic mice. *Hypertension* **43** 1003-1010.
- Smith MS, Freeman ME & Neill JD 1975 The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* **96** 219-226.
- Sodersten P & Hansen S 1977 Effects of oestradiol and progesterone on the induction and duration of sexual receptivity in cyclic female rats. *J Endocrinol* **74** 477-485.
- Song K, Allen AM, Paxinos G & Mendelsohn FA 1991 Angiotensin II receptor subtypes in rat brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **18** 93-96.
- Song Z, Levin BE, McArdle JJ, Bakhos N & Routh VH 2001 Convergence of pre- and postsynaptic influences on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes* **50** 2673-2681.
- Spicer LJ & Francisco CC 1997 The adipose obese gene product, leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function. *Endocrinology* **138** 3374-3379.
- Spinedi E & Negro-Vilar A 1983 Angiotensin II and ACTH release: site of action and potency relative to corticotropin releasing factor and vasopressin. *Neuroendocrinology* **37** 446-453.
- Steele MK 1987 Effects of angiotensins injected into various brain areas on luteinizing hormone release in female rats. *Neuroendocrinology* **46** 401-405.
- Steele MK, Gallo RV & Ganong WF 1983 A possible role for the brain renin-angiotensin system in the regulation of LH secretion. *Am J Physiol* **245** R805-810.
- Steele MK, Gallo RV & Ganong WF 1985 Stimulatory or inhibitory effects of angiotensin II upon LH secretion in ovariectomized rats: a function of gonadal steroids. *Neuroendocrinology* **40** 210-216.
- Steele MK, Negro-Vilar A & McCann SM 1981 Effect of angiotensin II on in vivo and in vitro release of anterior pituitary hormones in the female rat. *Endocrinology* **109** 893-899.
- Steele MK, Stephenson KN, Meredith JM & Levine JE 1992 Effects of angiotensin II on LHRH release, as measured by in vivo microdialysis of the anterior pituitary gland of conscious female rats. *Neuroendocrinology* **55** 276-281.
- Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS & Lazar MA 2001 The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409** 307-312.
- Suzuki N, Shinonaga M, Hirata K, Inoue S & Kuwabara T 1990 Hypothalamic obesity due to hydrocephalus caused by aqueductal stenosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **53** 1102-1103.
- Syktotis GP & Papavassiliou AG 2001 Serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1: a novel target for the reversal of insulin resistance. *Mol Endocrinol* **15** 1864-1869.
- Tanti JF, Gremeaux T, van Obberghen E & Le Marchand-Brustel Y 1994 Serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 modulates insulin receptor signaling. *J Biol Chem* **269** 6051-6057.
- Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA & Tepper RI 1995 Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* **83** 1263-1271.
- Taylor AE, McCourt B, Martin KA, Anderson EJ, Adams JM, Schoenfeld D & Hall JE 1997 Determinants of abnormal gonadotropin secretion in clinically defined women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **82** 2248-2256.
- Terasawa E & Fernandez DL 2001 Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocr Rev* **22** 111-151.
- Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA & Smith RD 1993 Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* **45** 205-251.
- Tomono Y, Iwai M, Inaba S, Mogi M & Horiuchi M 2008 Blockade of AT1 receptor improves adipocyte differentiation in atherosclerotic and diabetic models. *Am J Hypertens* **21** 206-212.

- Tortoriello DV, McMinn J & Chua SC 2004 Dietary-induced obesity and hypothalamic infertility in female DBA/2J mice. *Endocrinology* **145** 1238-1247.
- Truitt WA, Shipley MT, Veening JG & Coolen LM 2003 Activation of a subset of lumbar spinothalamic neurons after copulatory behavior in male but not female rats. *J Neurosci* **23** 325-331.
- Tsutsumi K & Saavedra JM 1991 Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT1 and AT2) in rat brain. *Am J Physiol* **261** R209-216.
- Umemura S, Nyui N, Tamura K, Hibi K, Yamaguchi S, Nakamaru M, Ishigami T, Yabana M, Kihara M, Inoue S & Ishii M 1997 Plasma angiotensinogen concentrations in obese patients. *Am J Hypertens* **10** 629-633.
- Urbanski HF & Pau KY 1998 A biphasic developmental pattern of circulating leptin in the male rhesus macaque (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* **139** 2284-2286.
- Vale W, Vaughan J, Smith M, Yamamoto G, Rivier J & Rivier C 1983 Effects of synthetic ovine corticotropin-releasing factor, glucocorticoids, catecholamines, neurohypophysial peptides, and other substances on cultured corticotropic cells. *Endocrinology* **113** 1121-1131.
- van den Pol AN & Trombley PQ 1993 Glutamate neurons in hypothalamus regulate excitatory transmission. *J Neurosci* **13** 2829-2836.
- Van Gaal L, Pi-Sunyer X, Despres JP, McCarthy C & Scheen A 2008 Efficacy and safety of rimonabant for improvement of multiple cardiometabolic risk factors in overweight/obese patients: pooled 1-year data from the Rimonabant in Obesity (RIO) program. *Diabetes Care* **31 Suppl 2** S229-240.
- Velloso LA, Folli F, Sun XJ, White MF, Saad MJ & Kahn CR 1996 Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** 12490-12495.
- Vicennati V, Gambineri A, Calzoni F, Casimirri F, Macor C, Vettor R & Pasquali R 1998 Serum leptin in obese women with polycystic ovary syndrome is correlated with body weight and fat distribution but not with androgen and insulin levels. *Metabolism* **47** 988-992.
- von Bohlen und Halbach O & Albrecht D 1998 Mapping of angiotensin AT1 receptors in the rat limbic system. *Regul Pept* **78** 51-56.
- von Schoultz B & Carlstrom K 1989 On the regulation of sex-hormone-binding globulin--a challenge of an old dogma and outlines of an alternative mechanism. *J Steroid Biochem* **32** 327-334.
- Wang J, Obici S, Morgan K, Barzilai N, Feng Z & Rossetti L 2001 Overfeeding rapidly induces leptin and insulin resistance. *Diabetes* **50** 2786-2791.
- Wang JM, Tan J & Leenen FH 2003 Central nervous system blockade by peripheral administration of AT1 receptor blockers. *J Cardiovasc Pharmacol* **41** 593-599.
- Wei S, Feng Y, Che FY, Pan H, Mzhavia N, Devi LA, McKinzie AA, Levin N, Richards WG & Fricker LD 2004 Obesity and diabetes in transgenic mice expressing proSAAS. *J Endocrinol* **180** 357-368.
- Wei S, Schmidt MD, Dwyer T, Norman RJ & Venn AJ 2009 Obesity and menstrual irregularity: associations with SHBG, testosterone, and insulin. *Obesity (Silver Spring)* **17** 1070-1076.
- Weiss R, Dziura J, Burgert TS, Tamborlane WV, Taksali SE, Yeckel CW, Allen K, Lopes M, Savoye M, Morrison J, Sherwin RS & Caprio S 2004 Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *N Engl J Med* **350** 2362-2374.
- Whitebread S, Mele M, Kamber B & de Gasparo M 1989 Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* **163** 284-291.
- Wild RA, Alaupovic P & Parker IJ 1992 Lipid and apolipoprotein abnormalities in hirsute women. I. The association with insulin resistance. *Am J Obstet Gynecol* **166** 1191-1196; discussion 1196-1197.
- Wildt L, Hutchison JS, Marshall G, Pohl CR & Knobil E 1981 On the site of action of progesterone in the blockade of the estradiol-induced gonadotropin discharge in the rhesus monkey. *Endocrinology* **109** 1293-1294.
- Wilkerson LA 1984 The female athlete. *Am Fam Physician* **29** 233-237.
- Williams G, McKibbin PE & McCarthy HD 1991 Hypothalamic regulatory peptides and the regulation of food intake and energy balance: signals or noise? *Proc Nutr Soc* **50** 527-544.

- Willis D, Mason H, Gilling-Smith C & Franks S 1996 Modulation by insulin of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone actions in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* **81** 302-309.
- Witcher JA & Freeman ME 1985 The proestrous surge of prolactin enhances sexual receptivity in the rat. *Biol Reprod* **32** 834-839.
- Wu TJ, Glucksman MJ, Roberts JL & Mani SK 2006 Facilitation of lordosis in rats by a metabolite of luteinizing hormone releasing hormone. *Endocrinology* **147** 2544-2549.
- Yoshimura Y, Karube M, Koyama N, Shiokawa S, Nanno T & Nakamura Y 1992 Angiotensin II directly induces follicle rupture and oocyte maturation in the rabbit. *FEBS Lett* **307** 305-308.
- Yoshimura Y, Karube M, Oda T, Koyama N, Shiokawa S, Akiba M, Yoshinaga A & Nakamura Y 1993 Locally produced angiotensin II induces ovulation by stimulating prostaglandin production in in vitro perfused rabbit ovaries. *Endocrinology* **133** 1609-1616.
- Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R & Dagenais G 2000 Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* **342** 145-153.
- Zeinoaldini S, Swarts JJ & Van de Heijning BJ 2006 A signaling role for leptin in puberty onset in female rats? *J Pediatr Endocrinol Metab* **19** 1239-1247.
- Zhang J, Pfaffendorf M, Zhang JS & Van Zwieten PA 1994 A non-competitive type of angiotensin-receptor antagonism by losartan in renal artery preparations. *Eur J Pharmacol* **252** 337-340.
- Zhuo J, Song K, Abdelrahman A & Mendelsohn FA 1994 Blockade by intravenous losartan of AT1 angiotensin II receptors in rat brain, kidney and adrenals demonstrated by in vitro autoradiography. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **21** 557-567.
- Zimmerman PA, Francis GL & Poth M 1995 Hormone-containing cosmetics may cause signs of early sexual development. *Mil Med* **160** 628-630.
- Zimmet P, Alberti KG & Shaw J 2001 Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* **414** 782-787.
- Zorad S, Fickova M, Zelezna B, Macho L & Kral JG 1995 The role of angiotensin II and its receptors in regulation of adipose tissue metabolism and cellularity. *Gen Physiol Biophys* **14** 383-391.

9. ANEXOS

9.1. Certificado de aprovação do projeto "Obesidade e reprodução em fêmeas: modulação da Angiotensina II" pelo Comitê de ética na experimentação animal e aulas práticas - UNIOESTE



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46

Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 1008 - <http://www.unioeste.br>

Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000

Marechal Cândido Rondon - PR

**Comitê de ética na experimentação animal e
aulas práticas – CEEAAP/UNIOESTE**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 10/09, sob o título "Obesidade e reprodução em fêmeas: modulação da Angiotensina II", sob a responsabilidade de Sara Cristina Sagae, tendo como período de realização início em 01/08/07 e término em 01/07/2010, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal e Aulas Práticas (CEEAAP/Unioeste) em reunião realizada em 04 de junho de 2009, conforme Ata nº 052009.

Marechal Cândido Rondon, PR., 05/06/2009

Coordenadora do CEEAAP/Unioeste
PORTARIA Nº 2618/2008 - GRE

DRª PATRICIA BARCELLOS COSTA
Médica Veterinária
CRMV/PR 07950

9.2. Artigo submetido à *Journal of Endocrinology*Manuscript submitted for review to *Journal of Endocrinology***Early onset obesity - induced alterations on reproductive parameters in female rats.**

Journal:	<i>Journal of Endocrinology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Research Paper
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	Saque, Sara; Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde Sanvitto, Gilberto; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde Franci, Celso; Fac. de Medicina de Ribeirao Preto, Univ. de Sao Paulo, Departamento de Fisiologia Bonfleur, Maria Lúcia; Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde Vanzela, Emerielle; Universidade Estadual de Campinas, 3Departamento de Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia
Keywords:	Obesity, Female reproduction, Hormone secretion, Ovulation, Lutenising Hormone

 The logo for ScholarOne Manuscript Central, consisting of a blue square icon with a white 'S' inside, followed by the text "scholarONE™ Manuscript Central" in a sans-serif font.

scholarONE™
Manuscript Central

joe@endocrinology.org

1 EARLY ONSET OBESITY-INDUCED ALTERATIONS IN REPRODUCTIVE PARAMETERS IN
2 FEMALE RATS

3

4 *Short title: Obesity induces alterations in female reproductive parameters*

5

6 Sara C. Sagae^{1,2}, Maria L. Bonfleur¹, Emerielle C. Vanzela³, Celso R. Franci⁴, Gilberto L.
7 Sanvitto²

8 ¹Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE),
9 Cascavel, PR, Brazil

10 ²Laboratório de Neuroendocrinologia, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da
11 Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

12 ³Departamento de Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia,
13 Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

14 ⁴Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo
15 (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

16

17 *Correspondence to Sara Cristina Sagae

18 E-mail: sarasagae@yahoo.com.br

1 Introduction

2 Overweight and obesity are important world public health concerns (Wei *et al.* 2004). The
3 increase in obesity prevalence in children and adolescents is one of the most alarming public health in
4 the world today. The childhood obesity reflects in adulthood and in this manner represents an early
5 beginning of a potentially life-time pathological process (Whitaker *et al.* 1997). In fact, obesity in early
6 life promotes cardiovascular disease and type 2 diabetes in human (Dietz 1994; Weiss *et al.* 2004;
7 Barker 2007) and in mice (Martins *et al.* 2008) adulthood.

8 Epidemiological data also support the concept that infertility is strongly associated with earlier
9 onset of excess body weight (Lake *et al.* 1997) and that alterations on reproductive parameters are
10 directly proportional to the duration of the diet (Yura *et al.* 2000). In rodents, diet-induced obese rats
11 (Frisch *et al.* 1975) and mice (Yura *et al.* 2000) showed an anticipation of puberty and was observed a
12 prolongation of estrous cycle of female rats (Innami *et al.* 1973; Glick *et al.* 1990). Additionally, obese
13 female DBA/2J mice presented a 60% decrease in natural pregnancy rates and a 50% suppression of
14 GnRH expression. These females showed diminished follicular development, although there was
15 evidence of past normal function in the form of corpora lutei and of normal ovulatory responses after
16 exogenous gonadotropin stimulation (Tortoriello *et al.* 2004). Obesity worsen the cases of polycystic
17 ovarian syndrome and probably promotes or complicates the ovulatory dysfunction of this disorder by
18 augmenting the insulin resistance and the hyperandrogenia (Rittmaster *et al.* 1993). Nevertheless,
19 independent of polycystic ovarian syndrome, there are evidences of an association between obesity and
20 reduced spontaneous and induced fertility (Tortoriello *et al.* 2004; Pasquali *et al.* 2006), menstrual
21 disorders (Rogers & Mitchell 1952; Douchi *et al.* 2002), and oligoamenorrhoea (Hartz *et al.* 1979).

22 In female rats, the increase of plasma luteinizing hormone in the proestrus is a key event for
23 ovulation. The preovulatory surge of LH depends on hypothalamic gonadotropin releasing hormone
24 (GnRH) (Levine *et al.* 1991; Ishikawa 1992), through a positive-feedback action of preovulatory
25 estradiol secretion and specific neural signals to initiate the surge (Levine 1997). The elevation in

1 estradiol and progesterone levels during the preovulatory period appear to provide a permissive signal
2 for the GnRH and LH surges (Levine 1997; Herbison 1998; Mahesh & Brann 1998; Micevych *et al.*
3 2003). The ovarian steroid hormones estradiol and progesterone (Flanagan-Cato 2000; Auger 2001;
4 Flanagan-Cato *et al.* 2001; Mani 2001) together with the pituitary prolactin (Witcher & Freeman 1985)
5 also have a modulating influences on neural circuits that regulate sexual behavior. The association of
6 obesity with lower gonadotropins and reduced levels of sex steroids has been established. Obese
7 women with disorders of menstrual cycle presents lower gonadotropins, reduced levels of sex steroids
8 (Sherman & Korenman 1974; Grenman *et al.* 1986) and lower estradiol and progesterone metabolites
9 compared with normal weight women (Santoro *et al.* 2004; Jain *et al.* 2007). However, the women
10 evaluated in these studies were healthy and did not presented insulin resistance or other kind of disease
11 in addition to menstrual cycle disorders.

12 Taken together, this data led us to enquire about how are the plasma concentrations of the
13 reproductive hormones in the proestrous afternoon in early-onset obese female rats by cafeteria diet
14 induced by cafeteria diet. Thus, since that the profile of several hormones related to the regulation of
15 female reproduction have to be synchronized to its success and considering the influence of the time of
16 beginning and duration of the diet to induced obesity, the present study aimed to describe the plasma
17 levels of estradiol, progesterone, LH and prolactin in the afternoon of the proestrus and in parallel, to
18 analyze the onset of puberty, ovulation and sexual behavior of rats submitted to cafeteria diet since
19 weaning.

1 Materials and Methods

2 Animals

3 Pregnant female Wistar rats were obtained from the colony of Universidade Estadual do Oeste do
4 Paraná and housed individually in the animal room in our laboratory. Approximately 7 days before
5 delivery, the females were housed individually and the presence of pups was checked twice a day. On
6 the day of birth (Day 0), the number of pups was culled to 8 per dam by randomly removing some of
7 them with minimal contact with remaining pups and the dam. After weaning (postnatal day 21) the
8 female pups were housed in groups of 3-5 per cage (41 cm long X 34 cm wide X 17 cm high),
9 according to body weight. All rats were maintained on a 12-h light-dark cycle (lights on from 0700 to
10 1900 h) and a room temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Two dietary experimental groups were used; a) control
11 group (CTL), that was fed on standard rodent chow (NutrilabTM, Colombo, Brazil; see Table I) and
12 water; and b) cafeteria group (CAF), that was fed on a cafeteria diet adapted from a previous study
13 (Prada *et al.* 2005) and received a pellet made of 37.5 % standard rodent chow, 25 % peanuts, 25 %
14 chocolate, and 12.5 % cookies, offered together with palatable food items comprising wafer, snacks,
15 cakes and biscuits, and water, as well as soft drinks alternated daily (PepsiTM and Guaraná
16 AntarcticaTM - see Table I). The diets were offered daily at the same time (1230 to 1330 h) and the rats
17 had access to all diet components in excess at any time. Each day, leftovers were collected and replaced
18 with new items. This was a key point to our experiment that assured success of the hypercaloric
19 regimen. After 70 days of cafeteria feeding or standard rodent chow, the rats were killed and body
20 weight, and perigonadal and retroperitoneal fat pads weights were measured. Experiments were
21 performed in accordance with the National Institutes of Health (NIH) guidelines and were approved by
22 the University Research Committee.

23

24 Onset of puberty, estrous cycle and number of oocytes

1 Since the 22nd day of age, vaginal opening was verified daily in all females of both groups to detect the
2 onset of puberty. After the 70th day of age, vaginal smears were taken daily at 09:00 h and analyzed
3 under the microscope and the mean frequency of diestrus, metestrus, proestrus and estrus was
4 compared between the groups. On the estrus morning (09:00 h), animals that had their blood collected
5 for hormone assay on the previous day were decapitated, the ovaries were removed and the oviduct was
6 dissected and squashed between 2 glass slides. The number of oocytes of both oviduct ampullae was
7 counted under the microscope (Zeiss, Goettingen, Germany) with a 2.5 X lens.

8

9 **Female sexual behavior**

10 Virgin female rats aged 85 days were tested with a proven breeder male (not subjected to cafeteria diet
11 or stimulation) in the observation cage (70 X 70 X 35 cm). During the dark period of the cycle (from
12 20:00 to 21:00 h), the rats were videotaped for 15 min, and the total numbers of mounts and lordosis
13 were recorded. The index of female sexual receptiveness was calculated by dividing the number of
14 lordosis by the number of mounts (Sodersten & Hansen 1977).

15

16 **Intravenous glucose tolerance test (ivGTT)**

17 For intravenous glucose tolerance test, blood samples were collected through jugular catheter inserted
18 one day before the experiment and glucose and insulin levels (time 0) were measured in overnight-
19 fasted rats. A glucose load of 1.5 g/kg body weight was injected (*iv*) and additional blood samples were
20 collected at 15, 30 and 60 min to measure blood glucose and plasma insulin. Blood glucose was
21 measured using a glucose analyzer (AccuChek Advantage, Roche Diagnostic, Switzerland). For the
22 insulin assay, the blood samples were centrifuged at 3000 g for 15 min and plasma was separated and
23 stored frozen at -20 °C for posterior measurement by radioimmunoassay (RIA). HOMA was used to
24 evaluate insulin resistance (Santoro *et al.* 2004).

25

1 Triglycerides (TG) and cholesterol test

2 Food was withdrawn 12-14 h before the experiments and blood samples were taken for the
3 determination of the plasma concentration of total cholesterol, HDL, LDL and TG. Lipids were
4 measured in a routine diagnostic analyzer (CHOD-PAP, cholesterol oxidase-peroxidase enzymatic
5 colorimetric assay) and TG were also determined (GPO-PAP, glycerol-3-phosphate oxidase enzymatic
6 colorimetric assay).

7

8 Jugular catheter and blood sampling

9 One day before the proestrus, at between 11:00 and 12:00h, the animals of both groups (control and
10 cafeteria) were submitted to jugular vein catheterization. The rats were anesthetized with
11 tribromoethanol (Aldrich; 1 ml of a 2.5% solution/100 g body weight; *i.p.*) (Poletini *et al.* 2003), and a
12 silastic catheter was inserted through the external jugular vein into the right atrium (Harms & Ojeda
13 1974). At the time of experiment, a length of polyethylene tubing (PE-50) was connected to the jugular
14 catheter, filled with heparinized saline (200 I.U. heparin/ml) and the rats were allowed to remain
15 undisturbed in their cages for an additional 30 min until the beginning of the experiment. Blood
16 samples (0.6 ml) were collected every hour (13:00-18:00 h) in the afternoon of proestrus in plastic
17 heparinized syringes. After each blood sample was taken, 0.6 ml of 0.9% NaCl (saline) solution was
18 injected to replace the volume removed. The blood samples were centrifuged at 3 000 g for 15 min.
19 Plasma was separated and stored frozen at -20 °C until estradiol, progesterone, LH and prolactin
20 determination by RIA.

21

22 RIA

23 Plasma estradiol and progesterone concentrations were determined by double-antibody RIA using
24 specific Estradiol DSL – 4400 and Progesterone DSL – 3400 kits, respectively (Diagnostics Systems
25 Laboratories, Texas, USA). The lower limit for detection was 7.5 pg/ml, for estradiol and 0.34 ng/ml

1 for progesterone. RIAs for LH and prolactin were performed using specific kits provided by the
2 National Hormone and Peptide Program (Harbor-UCLA Medical Center, USA). The antibodies used
3 were anti-rat LH-S10 and PRL-S9; the standards were LH-RP3 and PRL-RP3. The lowest limit for
4 detection was 0.04 ng/ml for LH and 0.19 ng/ml for prolactin.

5

6 **Statistical analysis**

7 Blood glucose and plasma levels of insulin, TG, total cholesterol, HDL, LDL, estradiol, progesterone,
8 LH, prolactin were expressed as means \pm S.E.M. The significance of differences between groups and
9 blood samples collected through-out the day was determined by two-way ANOVA with repeated
10 measures followed by the Newman-Keuls test for multiple comparisons. The area under the curves
11 (AUCs), expressed as means \pm S.E.M., for plasma estradiol, progesterone, LH and PRL in proestrus and
12 glycaemia and insulinemia were calculated and the significance of differences between the groups was
13 determined by the Student's *t*-test. The number of oocytes was expressed as a median (with
14 interquartile range) and compared between the two groups by Mann-Whitney's *U* test. The mean
15 frequency of diestrus, metestrus, proestrus and estrus and the means \pm S.E.M of HOMA and sexual
16 receptiveness were compared between the 2 groups by the Student *t*-test. In all cases, the level of
17 significance was set as $P < 0.05$.

1 Results

2 At the 30th day of age, retroperitoneal (0.283 ± 0.019 , $n = 12$) and perigonadal (0.495 ± 0.015 , n
3 $= 12$) fats of cafeteria group were higher than retroperitoneal (0.047 ± 0.032 , $n = 12$) and perigonadal
4 (0.119 ± 0.032 , $n = 12$) fats of the control group (g/100g of body weight; $P < 0.0001$). At adult age,
5 cafeteria-diet fed rats also presented higher perigonadal as well as retroperitoneal fat pads and body
6 weight than control rats, although no difference was observed in the nasoanal length of the rats of the
7 cafeteria group, compared to the control group (Table II).

8 Increased TG and LDL levels were observed in the plasma of cafeteria females. Moreover,
9 HDL was reduced in cafeteria rats compared to control rats, whereas no difference was observed
10 between groups in total cholesterol (Table II). Higher plasma insulin baseline levels were observed in
11 cafeteria females than in control rats (Figure 1A). After the injection of glucose (ivGTT), plasma
12 insulin levels increased in both groups at 15 min ($P < 0.001$) and remained higher in the CAF females
13 at 30 and 60 min ($P < 0.001$). Significant main effects for group ($F = 82.13$, $P < 0.001$) and time of day
14 ($F = 39.94$, $P < 0.001$) were detected. No significant interactions among groups and time of day were
15 detected ($F = 1.78$, $P = 0.16$). The AUC of cafeteria group (Figure 1B) was higher than that of the
16 control group ($t_{23} = 16.03$, $P < 0.0001$). The basal levels of glucose of cafeteria rats (figure 1C) did not
17 differ from those of controls (77.72 ± 5.01 vs 80.86 ± 2.50 , respectively); however, its levels was
18 higher in the cafeteria group at 15 ($P < 0.001$), 30 ($P < 0.001$) and at 60 min ($P < 0.05$) after a glucose
19 load compared to the control group. A constant time-dependent decrease was observed in glucose
20 levels in both groups. Significant main effects for group ($F = 60.79$, $P < 0.0001$) and time of day ($F =$
21 321.5 , $P < 0.0001$) were detected. Significant interaction among groups and time of day were detected
22 ($F = 19.48$, $P < 0.0001$). The AUC (Figure 1D) was higher in the cafeteria group, compared to the
23 control group ($t_{23} = 8.52$, $P < 0.0001$). Analysis of HOMA revealed an improvement in HOMA-IR
24 (0.93 ± 0.17) in the cafeteria group, compared to the control group (7.09 ± 0.69).

1 Rats fed on the cafeteria diet presented vaginal opening significantly earlier ($26.66 \pm 0.$) than
2 the rats of the control group (29.40 ± 0.64 , $P < 0.01$). The mean frequency of diestrus phases was
3 higher in CAF rats (10.80 ± 0.42 , $P < 0.05$) than in CON rats (15.33 ± 0.41) and metestrus ($5.00 \pm$
4 0.34), proestrus (4.50 ± 0.27) and estrus (6.78 ± 0.39) phases did not differ from controls (5.07 ± 0.25 ,
5 5.20 ± 0.29 , 7.80 ± 0.31 , respectively). Analysis of the female sexual behavior indicated no effect ($P =$
6 0.126) of cafeteria diet on this parameter, compared to controls.

7 Results showed that the cafeteria diet reduced the reproductive capability of females (Figure 2)
8 by reducing ovulation rates. The median number (interquartile range) of oocytes in cafeteria diet-fed
9 females [1(0/6)] was significantly lower than in chow-fed rats [10 (8/12)].

10 Figure 3 shows estradiol and progesterone plasma concentrations in the afternoon of proestrous
11 in adult cafeteria diet and chow fed Wistar females. For estradiol (Figure 3A), no significant effects for
12 group ($F = 0.05$, $P = 0.83$) and time of day ($F = 1.28$, $P = 0.28$) and interaction among groups and time
13 of day ($F = 0.56$, $P = 0.72$) were detected. Newman Keuls *post hoc* analysis revealed an increase in
14 estradiol plasma concentration in the control group at 14:00 h compared to the other time evaluated. A
15 synchronized increase/decrease pattern of estradiol secretion was evidenced, however, no difference
16 was observed in estradiol plasma concentration in the cafeteria group between the times analyzed.
17 There were no differences in estradiol plasma concentration at all times analyzed in the control group,
18 compared to the cafeteria group. The AUC (Figure 3B) analysis showed no difference between groups
19 ($t_{25} = 0.10$).

20 For plasma progesterone (Figure 3C), significant main effects for group ($F = 10.35$, $P < 0.01$)
21 and time of day ($F = 2.87$, $P < 0.05$) and significant interaction among groups and time of day were
22 detected ($F = 2.50$, $P < 0.05$). *Post hoc* analysis revealed that the progesterone plasma concentration in
23 the control group reached significantly higher levels at 1500 h compared to 13:00, 14:00, 16:00, 17:00
24 and 18:00 h and at 15:00 h in the cafeteria group. No elevation in progesterone plasma concentration
25 was observed in the cafeteria group, which remained similar at all times analyzed, compared to lower

1 plasma progesterone levels observed in control females. The AUC (Figure 3D) of the cafeteria group
2 was lower than in the control group ($t_{23} = 1.77, P < 0.0001$).

3 Figure 4 shows LH and prolactin plasma concentrations in the afternoon of proestrous in adult
4 cafeteria diet and chow fed Wistar females. For LH (Figure 4A), significant main effects for group ($F =$
5 $5.33, P = 0.038$) and time of day ($F = 29.44, P < 0.0001$) were detected. Significant interaction among
6 groups and time of day were detected ($F = 17.40, P < 0.0001$). *Post hoc* analysis revealed that LH
7 plasma concentration in control group increased significantly to higher levels at 17:00 h, compared to
8 the other times evaluated and to LH plasma concentration of the cafeteria group at 17:00 h. LH plasma
9 concentration was significantly higher at 1700 and 1800 h compared to 13:00, 14:00, 15:00 and 16:00
10 h in the cafeteria group and LH plasma concentration at 1800h was higher compared to 1700 h. The
11 AUC (Figure 4B) was lower in the cafeteria group, compared to control group ($t_{23} = 0.72, P < 0.0001$).

12 For plasma prolactin (Figure 4C), significant main effects for group ($F = 5.86, P < 0.05$) and
13 time of day ($F = 4.06, P < 0.01$) were detected. No significant interactions among groups and time of
14 day were detected ($F = 1.39, P = 0.24$). *Post hoc* analysis revealed that there was an increase in
15 prolactin plasma concentration in the control and cafeteria groups at 16:00 h until 1800 h, compared to
16 respective prolactin levels at 13:00, 14:00 and 15:00 h. At 18:00 h, prolactin plasma concentration in
17 the cafeteria group was significantly higher than controls at the same time. The AUC (Figure 4D) of
18 the cafeteria group was higher than that of the control group ($t_{23} = 1.29, P = 0.02$).

19 (Levi, 1949 #15)

1 Discussion

2 In the present study, we have analyzed the plasma concentrations of several hormones related to
3 reproduction in the proestrus afternoon, as well as the onset of puberty, ovulation rates and sexual
4 behavior of cafeteria diet – early induced obese female rats. Our study demonstrates that the cafeteria
5 diet offered since weaning induced an improved storage of fat at the onset of puberty and at adult age
6 in female rats, as evidenced by the higher content of fat pads as a percentage of body weight at both
7 ages. In addition, the impaired glucose tolerance observed in cafeteria-fed females, in this study, may
8 account for an alteration in glucose-induced insulin secretion by pancreatic islets, since plasma levels
9 of insulin was enhanced in cafeteria-fed rats in the glucose tolerance test. This result shows an insulin
10 resistance, as demonstrated by HOMA-IR, although fasted glucose was in a normal range. As
11 previously described, diet induced-obesity promotes insulin resistance (Kretschmer *et al.* 2005) and
12 reduced expression of GLUT 4 in adipocytes and in non-adipose tissues such as liver, heart and skeletal
13 muscle (DeFronzo *et al.* 1981; Kretschmer *et al.* 2005), resulting in an impaired glucose tolerance in
14 animals (Ahren *et al.* 1999; Clegg *et al.* 2005) and humans (Jahns *et al.* 2001; Chopra *et al.* 2002).
15 Indeed, high concentrations of circulating triacylglycerols (Friedman & Kim 1985; Kretschmer *et al.*
16 2005) and of LDLs and low concentrations of HDLs (Despres *et al.* 1990; Lamarche *et al.* 1997) are
17 detected in obese animals, highlighting our data in cafeteria diet – early induced obese female rats.

18 The association between obesity and alterations in reproductive function has long been
19 recognized (Rogers & Mitchell 1952; Hartz *et al.* 1979; Pasquali *et al.* 2006). To our knowledge, this
20 is the first study that associates reproductive parameters with the profile of main reproductive
21 hormones in proestrus afternoon in a model of obesity induced by diet since weaning in female rats. As
22 already stated in the introduction, infertility is strongly associated with earlier onset of excess body
23 weight (Lake *et al.* 1997) and the intake of high-calorie food has been initiating earlier and increasing
24 rapidly in countries worldwide. Consistent with the early life origins of diseases, a recent study
25 suggested that obesity and metabolic syndrome could involve primary peripheral mechanisms through

1 early overnutrition on increased adipogenic and lipogenic capacity of adipocytes (Muhlhausler &
2 Smith 2009).

3 A previous report (Leigh *et al.* 1998) showed that diet-induced obesity in adult age promotes
4 significant disruption of estrous cyclicity in females. The estrous cycle length in rats fed with high-fat
5 diets is prolonged, due to a long diestrus phase (Innami *et al.* 1973; Glick *et al.* 1990), corroborating
6 with our data in females in early diet-induced obesity. Moreover, precocious vaginal opening, like that
7 seen in female rats fed on a high-energy diet (Frisch *et al.* 1975) was observed in our study. In the
8 current study, at 30th days, an age approximate to the onset of puberty in rats, cafeteria females
9 presented a higher retroperitoneal and perigonadal fat pads weights than control rats, suggesting that a
10 fat-derived or a fat-associated factor contributes to promote this alteration. In fact, nutritional status,
11 especially energy availability has long been known to affect puberty. However, little is known about
12 how nutritional states determine the timing of puberty. Some studies (Helmreich & Cameron 1992;
13 Cameron 1996) suggest that there exists a dynamic mechanism that is sensitive to energy availability
14 for the control of reproductive function and puberty. Many evidences has been suggested that leptin, a
15 peptide synthesized in adipose tissue is a key metabolic factor for the onset of puberty. Circulating
16 leptin concentrations increases and leptin binding activity decreases with puberty (Garcia-Mayor *et al.*
17 1997; Ahmed *et al.* 1999). Leptin also induces precocious puberty in mice (Chehab *et al.* 1997) and
18 prevents the delay in the onset of puberty in underfed female rats (Gruaz *et al.* 1998).

19 The cafeteria diet significantly reduced the number of oocytes in the morning of the estrus.
20 Paradoxically, a previous study show a similar number of ovulation in diet-induced obese female
21 DBA/2J mice compared to controls. However, this ovulatory response was induced by *ip* injection of
22 gonadotropins to induce superovulation (Tortoriello *et al.* 2004). The reduced ovulation evidenced in
23 this study is probably due to changes in the hormonal profiles detected in cafeteria-fed females.

24 Estradiol and progesterone play a crucial role in the regulation of several mechanisms of the
25 female reproductive system (Mahesh & Brann 1998; Conneely 2001). We demonstrated that the

1 patterns of estradiol and progesterone, as well as LH, FSH and prolactin concentrations, of control rats
2 on proestrus day are in agreement with previous studies (Freeman 1994). In females rats fed with
3 cafeteria diet, the plasma concentration of estradiol did not differ from controls at all times analyzed.
4 Obesity is considered a condition of increased estrogen production, the rate of which correlates
5 significantly with body weight and the amount of body fat (Kirschner *et al.* 1990) and obese females
6 usually have lower steroid binding globulin (SHBG) concentrations that may, in turn, lead to an
7 increased exposure of target tissues to free estrogens. In addition, obesity is associated with a decreased
8 formation of inactive 17 β -estradiol metabolites, which are virtually devoid of peripheral estrogen
9 activity, and a higher production of ester sulfate, an important reservoir of active estrogens (von
10 Schoultz & Carlstrom 1989). Altogether, these alterations lead to an increased ratio of active to inactive
11 estrogens as a final result. However, in spite of these changes, and in agreement with our results in
12 female rats, blood estrogen levels are usually normal in women with different obesity phenotypes,
13 although estrogen production rates have been found to be particularly increased in women with
14 peripheral obesity (Pasquali *et al.* 1993). This finding may be attributed to the ability of enlarged body
15 fat to act as storage for excess formed estrogen, contributing in this way to maintain normal levels of
16 circulating hormone.

17 We verified a reduction in LH secretion in CAF fed females compared to control females; the
18 reduction or absence of ovulation observed in the female rats in the present study is probably due to the
19 reduction in the LH secretion. A possible cause for this effect is the absence of the progesterone pulse
20 in the afternoon of proestrus from the preovulatory follicle, determined by interactions of estradiol and
21 LH. Estrogen is secreted gradually at higher levels from follicles during development and stimulates
22 the development of follicles by a positive feedback mechanism. The increase in progesterone plasma
23 levels is derived from the dominant follicle (Arai *et al.* 1998; Bao *et al.* 2000), but also from the
24 adrenal gland (Micevych *et al.* 2003). Histological study show that ovaries of dietary-induced obesity
25 in female DBA/2J mice presented diminished follicular development compared with their lean cohorts,

1 although there was evidence of past normal function in the form of corporea lutei. In addition, PCR
2 quantification of hypothalamic cDNA revealed a 50% suppression of GnRH expression (Tortoriello *et*
3 *al.* 2004). In this manner, we could postulate that a reduced final follicular development could be
4 avoiding the progesterone surge in the proestrus afternoon in cafeteria females, impairing the
5 synthesis/secretion of GnRH. In fact, the signal of the adequate moment of GnRH surge seems to
6 derive from the ovarian follicle, via the acute secretion of progesterone, when it is able to ovulate. This
7 follicular-originated progesterone has a clear and important effect in amplifying and advancing the
8 estrogen-induced surge of gonadotropins (Micevych *et al.* 2003). Although the surge of gonadotropins
9 can be induced by estradiol itself in females of monkeys (Wildt *et al.* 1981) and sheep (Kaynard *et al.*
10 1988; Moenter *et al.* 1990), a small improvement in progesterone secretion, after a pre improvement in
11 estradiol levels, is necessary for the occurrence of an adequate magnitude and timing of the
12 preovulatory gonadotropin surge and to promote ovulation success in female rats (Micevych *et al.*
13 2003) and women (Hotchkiss J; Knobil, 1994). The reduced surge of LH in females rats fed with
14 cafeteria diet and the consequently reduced ovulation is due, probably to the absence progesterone
15 secretion improvement during the proestrus afternoon. Alternatively, while the plasma estradiol
16 concentration of the cafeteria group did not differ from that of the control group, it could be speculated
17 if the pattern of estradiol secretion (as shown by an elevation in the reduction patterns of estradiol
18 levels in plasma) could not be promoting an indirect negative feedback on hypothalamus, inhibiting
19 GnRH synthesis/secretion and contributing to inhibit the gonadotropin surge in the proestrus afternoon
20 in cafeteria females.

21 The mechanisms by which an obesity-associated factor might influence pulsatile LH secretion
22 have yet to be determined. Insulin receptors have been identified on pituitary cells (Adashi *et al.* 1981),
23 and the hyperinsulinemia of obesity may operate at a pituitary level to dampen the LH pulse amplitude
24 (Karkanias *et al.* 1997). In addition, insulin participates in normal follicle development (Gharib *et al.*
25 1990; Richards 1994) and its alterations may be important in ovarian dysfunctions observed in a

1 number of disorders, including obesity and syndromes of insulin resistance (Geffner & Golde 1988;
2 Poretsky 1991). Excess insulin is capable of stimulating steroidogenesis and excessive androgen
3 production from the theca cell system (Poretsky *et al.* 1999) and is responsible for inhibiting SHBG
4 synthesis by the liver, contributing to reduce SHBG concentrations proportionally to its blood levels; as
5 such, excess insulin may further increase the delivery of free androgens to the target (Poretsky *et al.*
6 1999; Gambineri *et al.* 2002). The excess in local ovarian androgen production induced by excess
7 circulating insulin may also cause a deficit in follicular growth and favor anovulation (Willis *et al.*
8 1996; Poretsky *et al.* 1999). Insulin receptor signaling in the central nervous system is also known to be
9 important for female reproduction, since disruption of the insulin receptor gene in mice promotes
10 insulin resistance, elevated plasma insulin levels and triglyceridemia and induces impaired ovarian
11 follicle maturation and hypothalamic dysregulation of luteinizing hormone (Bruning *et al.* 2000).

12 Despite affecting ovulation, the cafeteria diet did not change sexual receptiveness in females.
13 Lordosis, the female receptive posture, requires coordinated actions of gonadal hormones with a
14 descending neural pathway from the ventromedial hypothalamic nucleus (McEwen 1981; Etgen *et al.*
15 1999; Flanagan-Cato 2000). The action of estradiol in the ventromedial hypothalamic nucleus is crucial
16 to the promotion of that behavior (Mathews & Edwards 1977; Pleim *et al.* 1989). The ovarian steroid
17 hormones estradiol and progesterone have profound modulatory influences on neural circuits that
18 regulate sexual behavior. During the estrous cycle, the sexual behavior is abolished by ovariectomy,
19 and reinstated by injections of estradiol followed by progesterone. Although treatment with estradiol
20 alone can induce some aspects of sexual behavior, administration of estradiol followed by P induces the
21 full complement of proprioceptive behaviors that occur during estrus (Auger 2001; Flanagan-Cato *et al.*
22 2001). Indeed, the prolactin surge also appears to be an important modulator of sexual behavior in
23 female rats. In the afternoon of the proestrus, suppression of the spontaneous release of prolactin
24 attenuates sexual receptivity (Witcher & Freeman 1985). The prolactin also acts centrally and/or
25 peripherally through stimulation of adrenal progesterone secretion to influence lordosis, since

1 ovariectomized and adrenalectomized rats treated with estradiol respond with lower levels of lordosis
2 than sham-operated controls (Witcher & Freeman 1985). While progesterone secretion did not increase
3 in the afternoon of the proestrus phase, the basal plasma concentration of progesterone observed,
4 together with estrogen and prolactin, was sufficient to promote sexual receptiveness in cafeteria-fed
5 females. Prolactin also seems to influence ovarian activity. However, the effects of prolactin on the
6 ovary depend on its plasma concentrations. While chronic high levels of prolactin have an inhibitory
7 effect on the hypothalamus-hypophysis axis and promote anovulatory cycles (Freeman *et al.* 2000),
8 transitory improvements in prolactin levels at specific moments of the cycle may be important for
9 follicle development. In fact, immunohistochemical studies show the presence of prolactin in follicles
10 and preovulatory oocytes (Phelps *et al.* 2003), suggesting an effect of this hormone on follicle and
11 oocyte maturation. However, the reduced ovulation cycle of cafeteria females probably is not due to a
12 prolactin effect since its concentration was not chronic elevated in proestrus afternoon.

13 We have to consider that naturally, the availability of metabolic fuels also affects reproduction.
14 The stored calories must be available for oxidation to the success of female reproduction. In fact, in
15 diabetic females both ovulation and female sexual behavior are inhibited (Karkanias *et al.* 1997).
16 Although they present high levels of glucose in circulation, it is not available for oxidization.
17 Nevertheless, when diabetic animals are fed diets rich in fatty acids, an oxidizable fuel for diabetics,
18 estrous behavior is restored (Ahdieh *et al.* 1983) and pregnancy with reduced number of pups is
19 achieved (Levi & Weinberg 1949). Considering that in our study the cafeteria group presented insulin
20 resistance with normal fasted glucose and in this manner, these rats can metabolize more glucose than
21 diabetic ones, and that availability of fatty acids in the cafeteria diet was high, it could be contributing
22 to the similar sexual behavior exhibited by cafeteria diet compared to chow diet-fed females. Moreover,
23 we describe anovulatory cycles and reduced number of oocytes in estrous morning of cafeteria group; it
24 could explain the impaired number of pups and reduced number of pregnancies obtained in study with
25 diabetic female rats compared to controls (Levi, 1949).

1 In conclusion, these studies show that the earlier onset of obesity and the resultant obesity-
2 induced metabolic alterations promotes an earlier onset of puberty and impairs the secretion of
3 progesterone by the follicles in the ovary of adult females. The absence of elevation of progesterone
4 levels during the afternoon of the proestrus phase in cafeteria group could be inhibiting the
5 preovulatory LH surge and, in consequence, reducing the ovulation rate observed in cafeteria females.

6

7 *Declaration of interest:* The authors declare that have no financial or conflict of interest.

8

9 *Acknowledgments:* This study was supported by grants from the Fundação Araucária de Apoio ao
10 Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná/ SETI, CNPq and FAPESP. We are
11 very grateful to Unioeste, UFRGS, USP and UNICAMP.

12

1 **References**

2

- 3 Adashi EY, Hsueh AJ & Yen SS 1981 Insulin enhancement of luteinizing hormone and follicle-
 4 stimulating hormone release by cultured pituitary cells. *Endocrinology* **108** 1441-1449.
- 5 Ahdieh HB, Hamilton JM & Wade GN 1983 Copulatory behavior and hypothalamic estrogen and
 6 progesterin receptors in chronically insulin-deficient female rats. *Physiol Behav* **31** 219-223.
- 7 Ahmed ML, Ong KK, Morrell DJ, Cox L, Drayer N, Perry L, Preece MA & Dunger DB 1999 Longitudinal
 8 study of leptin concentrations during puberty: sex differences and relationship to changes in body
 9 composition. *J Clin Endocrinol Metab* **84** 899-905.
- 10 Ahren B, Gudbjartsson T, Al-Amin AN, Martensson H, Myrsten-Axcrona U, Karlsson S, Mulder H &
 11 Sundler F 1999 Islet perturbations in rats fed a high-fat diet. *Pancreas* **18** 75-83.
- 12 Arai K, Ohshima K, Watanabe G, Arai K, Uehara K & Taya K 1998 Inhibition of ovarian follicular
 13 development associated with a decrease in luteinizing hormone levels during the estrous cycle of the
 14 rat. *Endocr J* **45** 539-546.
- 15 Auger AP 2001 Ligand-independent activation of progesterin receptors: relevance for female sexual
 16 behaviour. *Reproduction* **122** 847-855.
- 17 Bao B, Kumar N, Karp RM, Garverick HA & Sundaram K 2000 Estrogen receptor-beta expression in
 18 relation to the expression of luteinizing hormone receptor and cytochrome P450 enzymes in rat ovarian
 19 follicles. *Biol Reprod* **63** 1747-1755.
- 20 Barker DJ 2007 Obesity and early life. *Obes Rev* **8 Suppl 1** 45-49.
- 21 Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Muller-Wieland D
 22 & Kahn CR 2000 Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science*
 23 **289** 2122-2125.
- 24 Cameron JL 1996 Nutritional determinants of puberty. *Nutr Rev* **54** S17-22.
- 25 Chehab FF, Mounzih K, Lu R & Lim ME 1997 Early onset of reproductive function in normal female
 26 mice treated with leptin. *Science* **275** 88-90.
- 27 Chopra M, Galbraith S & Darnton-Hill I 2002 A global response to a global problem: the epidemic of
 28 overnutrition. *Bull World Health Organ* **80** 952-958.
- 29 Clegg DJ, Benoit SC, Reed JA, Woods SC, Dunn-Meynell A & Levin BE 2005 Reduced anorexic effects
 30 of insulin in obesity-prone rats fed a moderate-fat diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288**
 31 R981-986.
- 32 Conneely OM 2001 Perspective: female steroid hormone action. *Endocrinology* **142** 2194-2199.
- 33 DeFronzo RA, Jacot E, Jequier E, Maeder E, Wahren J & Felber JP 1981 The effect of insulin on the
 34 disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous
 35 catheterization. *Diabetes* **30** 1000-1007.
- 36 Despres JP, Moorjani S, Lupien PJ, Tremblay A, Nadeau A & Bouchard C 1990 Regional distribution of
 37 body fat, plasma lipoproteins, and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis* **10** 497-511.
- 38 Dietz WH 1994 Critical periods in childhood for the development of obesity. *Am J Clin Nutr* **59** 955-
 39 959.
- 40 Douchi T, Kuwahata R, Yamamoto S, Oki T, Yamasaki H & Nagata Y 2002 Relationship of upper body
 41 obesity to menstrual disorders. *Acta Obstet Gynecol Scand* **81** 147-150.
- 42 Etgen AM, Chu HP, Fiber JM, Karkanas GB & Morales JM 1999 Hormonal integration of
 43 neurochemical and sensory signals governing female reproductive behavior. *Behav Brain Res* **105** 93-
 44 103.
- 45 Flanagan-Cato LM 2000 Estrogen-induced remodeling of hypothalamic neural circuitry. *Front*
 46 *Neuroendocrinol* **21** 309-329.

- 1 Flanagan-Cato LM, Calizo LH & Daniels D 2001 The synaptic organization of VMH neurons that
2 mediate the effects of estrogen on sexual behavior. *Horm Behav* **40** 178-182.
- 3 Freeman ME 1994 In: *The ovarian cycle of the rat.*, pp. New York: Knobil & Neill.
- 4 Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A & Nagy G 2000 Prolactin: structure, function, and regulation of
5 secretion. *Physiol Rev* **80** 1523-1631.
- 6 Friedman CI & Kim MH 1985 Obesity and its effect on reproductive function. *Clin Obstet Gynecol* **28**
7 645-663.
- 8 Frisch RE, Hegsted DM & Yoshinaga K 1975 Body weight and food intake at early estrus of rats on a
9 high-fat diet. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72** 4172-4176.
- 10 Gambineri A, Pelusi C, Vicennati V, Pagotto U & Pasquali R 2002 Obesity and the polycystic ovary
11 syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* **26** 883-896.
- 12 Garcia-Mayor RV, Andrade MA, Rios M, Lage M, Dieguez C & Casanueva FF 1997 Serum leptin levels
13 in normal children: relationship to age, gender, body mass index, pituitary-gonadal hormones, and
14 pubertal stage. *J Clin Endocrinol Metab* **82** 2849-2855.
- 15 Geffner ME & Golde DW 1988 Selective insulin action on skin, ovary, and heart in insulin-resistant
16 states. *Diabetes Care* **11** 500-505.
- 17 Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA & Chin WW 1990 Molecular biology of the pituitary
18 gonadotropins. *Endocr Rev* **11** 177-199.
- 19 Glick Z, Yamini S, Lupien J & Sod-Moriah U 1990 Estrous cycle irregularities in overfed rats. *Physiol*
20 *Behav* **47** 307-310.
- 21 Grenman S, Ronnema T, Irjala K, Kaihola HL & Gronroos M 1986 Sex steroid, gonadotropin, cortisol,
22 and prolactin levels in healthy, massively obese women: correlation with abdominal fat cell size and
23 effect of weight reduction. *J Clin Endocrinol Metab* **63** 1257-1261.
- 24 Gruaz NM, Lalaoui M, Pierroz DD, Englaro P, Sizonenko PC, Blum WF & Aubert ML 1998 Chronic
25 administration of leptin into the lateral ventricle induces sexual maturation in severely food-restricted
26 female rats. *J Neuroendocrinol* **10** 627-633.
- 27 Harms PG & Ojeda SR 1974 A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular
28 vein. *J Appl Physiol* **36** 391-392.
- 29 Hartz AJ, Barboriak PN, Wong A, Katayama KP & Rimm AA 1979 The association of obesity with
30 infertility and related menstrual abnormalities in women. *Int J Obes* **3** 57-73.
- 31 Helmreich DL & Cameron JL 1992 Suppression of luteinizing hormone secretion during food
32 restriction in male rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): failure of naloxone to restore normal pulsatility.
33 *Neuroendocrinology* **56** 464-473.
- 34 Herbison AE 1998 Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons.
35 *Endocr Rev* **19** 302-330.
- 36 Hotchkiss J, Knobil E 1994 In: *The menstrual cycle and its neuroendocrine control.*, pp. New York:
37 Knobil & Neill.
- 38 Innami S, Yang MG, Mickelsen O & Hafs HD 1973 The influence of high-fat diets on estrous cycles,
39 sperm production and fertility of rats. *Proc Soc Exp Biol Med* **143** 63-68.
- 40 Ishikawa J 1992 Luteinizing hormone requirements for ovulation in the rat. *Biol Reprod* **46** 1144-1150.
- 41 Jahns L, Siega-Riz AM & Popkin BM 2001 The increasing prevalence of snacking among US children
42 from 1977 to 1996. *J Pediatr* **138** 493-498.
- 43 Jain A, Polotsky AJ, Rochester D, Berga SL, Loucks T, Zeitlian G, Gibbs K, Polotsky HN, Feng S, Isaac B
44 & Santoro N 2007 Pulsatile luteinizing hormone amplitude and progesterone metabolite excretion are
45 reduced in obese women. *J Clin Endocrinol Metab* **92** 2468-2473.
- 46 Karkanias GB, Morales JC & Li CS 1997 Deficits in reproductive behavior in diabetic female rats are
47 due to hypoinsulinemia rather than hyperglycemia. *Horm Behav* **32** 19-29.

- 1 Kaynard AH, Malpoux B, Robinson JE, Wayne NL & Karsch FJ 1988 Importance of pituitary and neural
2 actions of estradiol in induction of the luteinizing hormone surge in the ewe. *Neuroendocrinology* **48**
3 296-303.
- 4 Kirschner MA, Samojlik E, Drejka M, Szmal E, Schneider G & Ertel N 1990 Androgen-estrogen
5 metabolism in women with upper body versus lower body obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **70** 473-
6 479.
- 7 Kretschmer BD, Schelling P, Beier N, Liebscher C, Treutel S, Kruger N, Scholz HP & Haus A 2005
8 Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance.
9 *Life Sci* **76** 1553-1573.
- 10 Lake JK, Power C & Cole TJ 1997 Women's reproductive health: the role of body mass index in early
11 and adult life. *Int J Obes Relat Metab Disord* **21** 432-438.
- 12 Lamarche B, Tchernof A, Moorjani S, Cantin B, Dagenais GR, Lupien PJ & Despres JP 1997 Small,
13 dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men.
14 Prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Circulation* **95** 69-75.
- 15 Leigh AJ, Stock MJ, Lacey JH & Wilson CA 1998 Diet-induced loss of cyclic ovarian function at
16 normal body weight in a rodent model for bulimia nervosa. *J Reprod Fertil* **112** 217-223.
- 17 Levi JE & Weinberg T 1949 Pregnancy in alloxan diabetic rats. *Proc Soc Exp Biol Med* **72** 658-662.
- 18 Levine JE 1997 New concepts of the neuroendocrine regulation of gonadotropin surges in rats. *Biol*
19 *Reprod* **56** 293-302.
- 20 Levine JE, Bauer-Dantoin AC, Bescke LM, Conaghan LA, Legan SJ, Meredith JM, Strobl FJ, Urban
21 JH, Vogelsong KM & Wolfe AM 1991 Neuroendocrine regulation of the luteinizing hormone-releasing
22 hormone pulse generator in the rat. *Recent Prog Horm Res* **47** 97-151; discussion 151-153.
- 23 Mahesh VB & Brann DW 1998 Regulation of the preovulatory gonadotropin surge by endogenous
24 steroids. *Steroids* **63** 616-629.
- 25 Mani S 2001 Ligand-independent activation of progesterin receptors in sexual receptivity. *Horm Behav*
26 **40** 183-190.
- 27 Martins MR, Vieira AK, de Souza EP & Moura AS 2008 Early overnutrition impairs insulin signaling in
28 the heart of adult Swiss mice. *J Endocrinol* **198** 591-598.
- 29 Mathews D & Edwards DA 1977 Involvement of the ventromedial and anterior hypothalamic nuclei in
30 the hormonal induction of receptivity in the female rat. *Physiol Behav* **19** 319-326.
- 31 McEwen BS 1981 Neural gonadal steroid actions. *Science* **211** 1303-1311.
- 32 Micevych P, Sinchak K, Mills RH, Tao L, LaPolt P & Lu JK 2003 The luteinizing hormone surge is
33 preceded by an estrogen-induced increase of hypothalamic progesterone in ovariectomized and
34 adrenalectomized rats. *Neuroendocrinology* **78** 29-35.
- 35 Moenter SM, Caraty A & Karsch FJ 1990 The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing
36 hormone in the ewe. *Endocrinology* **127** 1375-1384.
- 37 Muhlhausler B & Smith SR 2009 Early-life origins of metabolic dysfunction: role of the adipocyte.
38 *Trends Endocrinol Metab* **20** 51-57.
- 39 Pasquali R, Casimirri F, Cantobelli S, Labate AM, Venturoli S, Paradisi R & Zannarini L 1993 Insulin and
40 androgen relationships with abdominal body fat distribution in women with and without
41 hyperandrogenism. *Horm Res* **39** 179-187.
- 42 Pasquali R, Vicennati V, Cacciari M & Pagotto U 2006 The hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity
43 in obesity and the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* **1083** 111-128.
- 44 Phelps JY, Bugg EM, Shambloot MJ, Vlahos NP, Whelan J & Zacur HA 2003 Prolactin gene expression
45 in human ovarian follicular cells. *Fertil Steril* **79** 182-185.
- 46 Pleim ET, Brown TJ, MacLusky NJ, Etgen AM & Barfield RJ 1989 Dilute estradiol implants and
47 progesterin receptor induction in the ventromedial nucleus of the hypothalamus: correlation with
48 receptive behavior in female rats. *Endocrinology* **124** 1807-1812.

- 1 Poletini MO, Szawka RE, Freitas Marcon RM, Veiga MD, Franci CR & Anselmo-Franci JA 2003 A
 2 method to study preovulatory surges of gonadotropins. *Brain Res Brain Res Protoc* **12** 41-48.
- 3 Poretsky L 1991 On the paradox of insulin-induced hyperandrogenism in insulin-resistant states.
 4 *Endocr Rev* **12** 3-13.
- 5 Poretsky L, Cataldo NA, Rosenwaks Z & Giudice LC 1999 The insulin-related ovarian regulatory
 6 system in health and disease. *Endocr Rev* **20** 535-582.
- 7 Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, Corezola do Amaral ME, Hoer
 8 NF, Boschero AC & Saad MJ 2005 Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase
 9 activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion.
 10 *Endocrinology* **146** 1576-1587.
- 11 Richards JS 1994 Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev* **15** 725-751.
- 12 Rittmaster RS, Deshwal N & Lehman L 1993 The role of adrenal hyperandrogenism, insulin resistance,
 13 and obesity in the pathogenesis of polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **76** 1295-
 14 1300.
- 15 Rogers J & Mitchell GW, Jr. 1952 The relation of obesity to menstrual disturbances. *N Engl J Med* **247**
 16 53-55.
- 17 Santoro N, Lasley B, McConnell D, Allsworth J, Crawford S, Gold EB, Finkelstein JS, Greendale
 18 GA, Kelsey J, Korenman S, Luborsky JL, Matthews K, Midgley R, Powell L, Sabatine J, Schocken
 19 M, Sowers MF & Weiss G 2004 Body size and ethnicity are associated with menstrual cycle alterations
 20 in women in the early menopausal transition: The Study of Women's Health across the Nation (SWAN)
 21 Daily Hormone Study. *J Clin Endocrinol Metab* **89** 2622-2631.
- 22 Sherman BM & Korenman SG 1974 Measurement of plasma LH, FSH, estradiol and progesterone in
 23 disorders of the human menstrual cycle: the short luteal phase. *J Clin Endocrinol Metab* **38** 89-93.
- 24 Sodersten P & Hansen S 1977 Effects of oestradiol and progesterone on the induction and duration of
 25 sexual receptivity in cyclic female rats. *J Endocrinol* **74** 477-485.
- 26 Tortorello DV, McMinn J & Chua SC 2004 Dietary-induced obesity and hypothalamic infertility in
 27 female DBA/2J mice. *Endocrinology* **145** 1238-1247.
- 28 von Schoultz B & Carlstrom K 1989 On the regulation of sex-hormone-binding globulin—a challenge
 29 of an old dogma and outlines of an alternative mechanism. *J Steroid Biochem* **32** 327-334.
- 30 Wei S, Feng Y, Che FY, Pan H, Mzhavia N, Devi LA, McKinzie AA, Levin N, Richards WG & Fricker LD
 31 2004 Obesity and diabetes in transgenic mice expressing proSAAS. *J Endocrinol* **180** 357-368.
- 32 Weiss R, Dziura J, Burgert TS, Tamborlane WV, Taksali SE, Yeckel CW, Allen K, Lopes M, Savoye
 33 M, Morrison J, Sherwin RS & Caprio S 2004 Obesity and the metabolic syndrome in children and
 34 adolescents. *N Engl J Med* **350** 2362-2374.
- 35 Whitaker RC, Wright JA, Pepe MS, Seidel KD & Dietz WH 1997 Predicting obesity in young adulthood
 36 from childhood and parental obesity. *N Engl J Med* **337** 869-873.
- 37 Wildt L, Hutchison JS, Marshall G, Pohl CR & Knobil E 1981 On the site of action of progesterone in
 38 the blockade of the estradiol-induced gonadotropin discharge in the rhesus monkey. *Endocrinology* **109**
 39 1293-1294.
- 40 Willis D, Mason H, Gilling-Smith C & Franks S 1996 Modulation by insulin of follicle-stimulating
 41 hormone and luteinizing hormone actions in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. *J*
 42 *Clin Endocrinol Metab* **81** 302-309.
- 43 Witcher JA & Freeman ME 1985 The proestrous surge of prolactin enhances sexual receptivity in the
 44 rat. *Biol Reprod* **32** 834-839.
- 45 Yura S, Ogawa Y, Sagawa N, Masuzaki H, Itoh H, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Fujii S & Nakao K 2000
 46 Accelerated puberty and late-onset hypothalamic hypogonadism in female transgenic skinny mice
 47 overexpressing leptin. *J Clin Invest* **105** 749-755.

48

49

Figure 1. Plasma Insulin ((A) ng/ml) and AUC of insulin (B)) and blood glucose ((C) mg/dl and AUC of glucose (D)) of adult cafeteria diet (CAF) and chow diet (CTL) fed females, determined by glucose tolerance test. Blood samples were collected at 0, 15, 30 and 60 min after glucose injection from a jugular catheter. Blood glucose and plasma insulin concentrations and each bar are represented by the means \pm SEM. $P < 0.05$ was accepted as significant. The number of animals (n) is given in parentheses.

Figure 2. Distribution of adult cafeteria diet (CAF) and chow diet (CTL) fed female rats according to number of oocytes on the day of estrus. $P < 0.05$ was significance accepted.

Figure 3. Plasma estradiol levels ((A) pg/mL), AUC of estradiol (B) and plasma progesterone levels ((C) pg/mL) and AUC of progesterone (D) in the afternoon of proestrus in adult cafeteria diet (CAF) and chow diet (CTL) fed Wistar females. Blood samples were collected at 13:00, 14:00, 15:00, 16:00, 17:00 and 18:00 h from a jugular catheter. Plasma hormone concentration and each bar are represented by the means \pm SEM. $P < 0.05$ was significance accepted. The number of animals (n) is given in parentheses.

Figure 4. Plasma LH levels ((A) pg/mL), AUC of LH (B) and plasma prolactin levels ((C) pg/mL) and AUC of prolactin (D) in the afternoon of proestrus in adult cafeteria diet (CAF) and chow diet (CTL) fed Wistar females. Blood samples were collected at 13:00, 14:00, 15:00, 16:00, 17:00 and 18:00 h from a jugular catheter. Plasma hormone concentration and each bar are represented by the means \pm SEM. $P < 0.05$ was significance accepted. The number of animals (n) is given in parentheses.

Table 1. Nutrient content of standard laboratory chow (Rodent chow, Nutrilab, Colombo, Brazil) and cafeteria diet

Table 2. Nasoanal length and body, retroperitoneal and perigonadal fat pads weight of CTL and CAF adult female rats. Content of fats was calculated as percentage of body weight

Figure 1

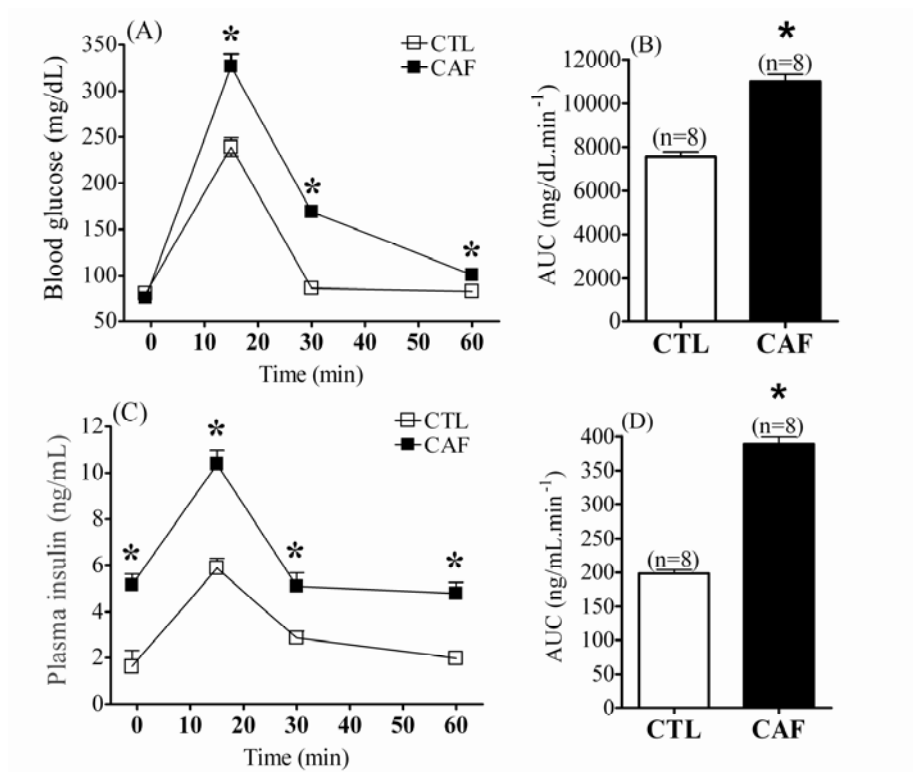


Figure 2

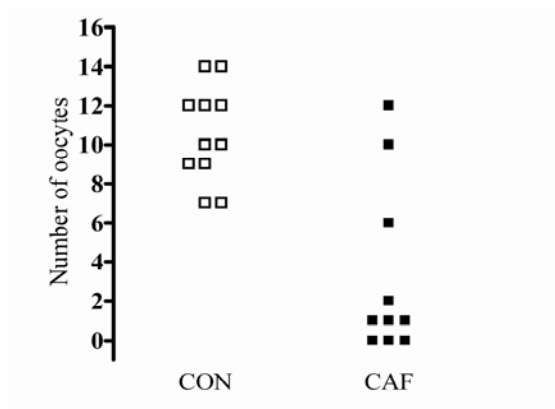


Figure 3

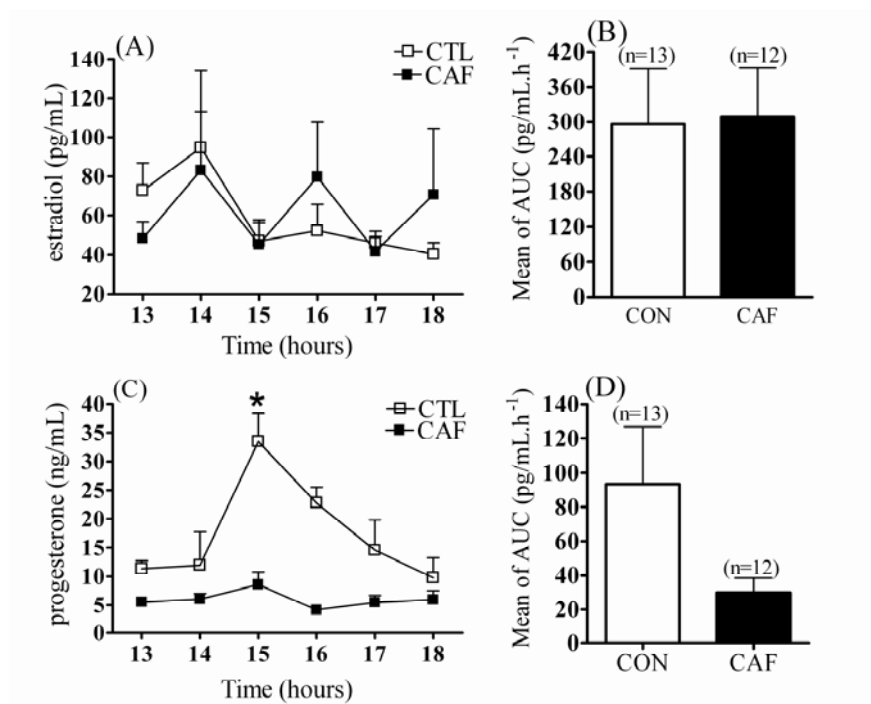
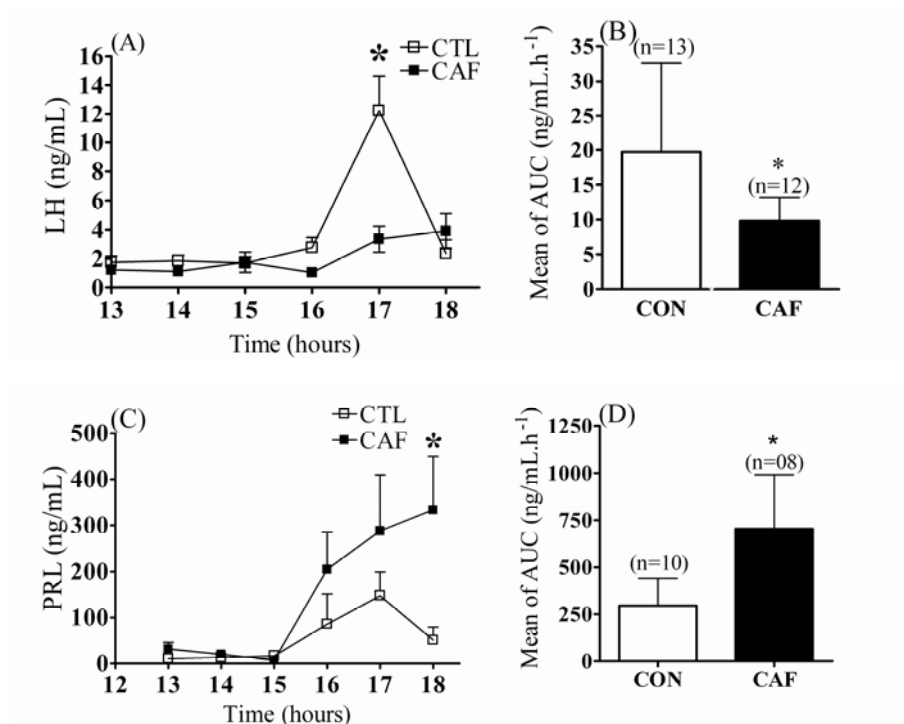


Figure 4



	Standard laboratory chow	Cafeteria diet
Protein	22% (22% of energy)	22 % (4% of energy)
Fat	10% (14% of energy)	24% (27% of energy)
Carbohydrate	60% (63% of energy)	49% (69% of energy)
Energy density	12.39 kJ/g	22.76 kJ/g

Table 2

	CTL	CAF
Nasoanal length (cm)	20,15 ± 0,18	20.61 ± 0.27
Body weight (g)	242.7 ± 3.79	263.69 ± 5.33*
Perigonadal fat (g/100g of body weight)	2.20 ± 0.26	6.12 ± 0.28*
Retroperitoneal fat (g/100g of body weight)	0.67 ± 0.04	2.11 ± 0.16*
Serum TG (mg/dL)	69.50 ± 5.50	111.50 ± 7.21*
Serum cholesterol (mg/dL)	69.75 ± 4.85	81.07 ± 3.16
Serum HDL (mg/dL)	30.25 ± 0.49	25.66 ± 1.73 *
Serum LDL (mg/dL)	41.05 ± 1.65	65.53 ± 2.43*

Data are means ± SEM (n = 8). * $P < 0,05$ vs CTL.

9.3. *Artigo a ser submetido*

BLOCKADE OF ANGIOTENSIN II AT₁ RECEPTOR IMPROVES REPRODUCTIVE PERFORMANCE IN OBESE FEMALE RATS

Short title: Blockade of AT₁ receptor improves reproduction in obese females

Sara C. Sagae^{1,2}, Celso R. Franci³, Gilberto L. Sanvitto²

¹Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, PR, Brazil

²Laboratório de Neuroendocrinologia, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

³Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

***Correspondence** to Sara Cristina Sagae

E-mail: sarasagae@yahoo.com.br

Keywords: angiotensin II, AT₁ receptor, female, losartan, reproduction, obesity

Abstract

The prevalence of overweight and obesity is increasing rapidly in the world and is present in individuals in all ages, including children, and its deleterious effects tend to extend to adulthood. Fat pad storage has been implicated on female reproductive disfunctions. The Angiotensin II (Ang II) has been related to the deleterious alterations associated with obesity and studies have shown an involvement of Ang II in the control of female reproduction. The aim of this work was to investigate the effect of the AT₁ receptor antagonist losartan, on the onset of puberty, estrous cycle, sexual behavior, ovulation rates and the profile of the gonadal steroids, luteinizing hormone (LH) and prolactin through the proestrus afternoon in obese female rats. The present study confirmed data obtained in other studies of the anticipation of the onset of puberty and the reduction of ovulation rates in female rats submitted to cafeteria diet, probably due to the absence of the preovulatory surge on proestrus afternoon of progesterone and of LH observed in this group. These females presented higher fat pads, insulin resistance, higher levels of triglycerides and LDL and reduced levels of HDL compared to controls. Losartan administration prevented the reduction in ovulation observed in females of cafeteria group, as well as in the LH surge on proestrus afternoon. Losartan seems to avoid partially the precocious onset of puberty and promotes an additional prolongation of the estrous cycle induced by cafeteria diet. Sexual behavior of female rats was not altered by the antagonist of AT₁ receptor of Ang II. In summary, these results suggest that the association of antagonist losartan of Ang II early-offered cafeteria diet, prevents the occurrence of fat pad storage, of insulin resistance and of the improvement on triglycerides and cholesterol LDL levels induced by cafeteria diet intake. The Ang II seems to contribute to the anticipation of puberty and to the prolongation of the estrous cycle, and the administration of losartan prevents the deleterious effects of fat storage on preovulatory LH and progesterone surges and, in consequence, the normal ovulation in female rats submitted to cafeteria diet is reestablished. These results evidenced a participation of Ang II, through its AT₁ receptor in the regulation of reproductive parameters in obese female rats.

Introduction

Obesity increased more than 75% since 1980 and about 1,5 billion individuals are overweight or obese in the world (Ogden *et al.* 2007). The prevalence of obesity in children and adolescents is one of the most alarming problems today in the world (Miller *et al.* 2004), considering that the pathologies acquired in childhood tend to extend to adulthood (Weiss *et al.* 2004; Barker 2007).

The LH surge in the proestrus afternoon is necessary for the occurrence of ovulation and depends on a pré-improvement of estradiol and progesterone plasma levels (Smith *et al.* 1975; Hotchkiss J; Knobil 1994; Micevych *et al.* 2003). Studies have shown that obesity is associated with the impairment of the reproductive functions in females (Mitchell & Rogers 1953; Hartz *et al.* 1979; Friedman & Kim 1985; Norman & Clark 1998; Bolumar *et al.* 2000; Fedorcsak *et al.* 2001; Tortoriello *et al.* 2004; Lintsen *et al.* 2005; Schroeder *et al.* 2009). Recently, we have demonstrated that cafeteria diet introduced in early in life induced obesity and inhibited the LH and progesterone surges in the proestrus afternoon, reducing ovulation in adulthood.

The Ang II has been strongly investigated in obese individuals (Engeli *et al.* 2003; Goossens *et al.* 2003) and with pathological alterations associated to obesity, including hypertension and atherosclerosis (Giacchetti *et al.* 2002; Mundy *et al.* 2007), hyperinsulinemia and insulin resistance (DeFronzo & Ferrannini 1991; Brands & Hall 1992). Previous studies demonstrated that losartan, an Ang II AT₁ receptor blocker prevents the hypertrophy of adipose tissue (Zorad *et al.* 1995) and reduces the weight and size of adipose tissue in diabetic mice (Tomono *et al.* 2008) as well as the insulin resistance (Julius *et al.* 2004; Shiuchi *et al.* 2004; Kjeldsen *et al.* 2006).

Ang II also is involved in the regulation of hypothalamus-pituitary axis (HPA). All renin-angiotensin system components are presents in ovaries (Husain *et al.* 1987; Daud *et al.* 1988) and in female rats, an improvement of hypothalamic Ang II occurs in the proestrus afternoon, promoting the secretion of gonadotrophin releasing hormone (GnRH) (Phillips *et al.* 1993; Phillips *et al.* 1995), that stimulates sexual behavior in rats (Rajendren & Moss 1993; Wu *et al.* 2006). Moreover,

intracerebroventricular (*icv*) injection of Ang II stimulates LH secretion and this effect is dependent of the ovarian steroids estradiol and progesterone (Steele *et al.* 1985). The preovulatory surge of LH improves intrafollicular renin activity, increasing Ang II levels in preovulatory follicles (Lightman *et al.* 1987). Ovulation and oocytes maturation seems to be stimulated by Ang II produced in ovaries (Pellicer *et al.* 1988; Yoshimura *et al.* 1992), through the induction of prostaglandins synthesis (Peterson *et al.* 1993; Yoshimura *et al.* 1993), that are involved in the rupture of follicles and oocyte extrusion (Espey 1992). However, in spite of all the evidences associating Ang II with obesity disorders and with the control of reproduction in females, no study was realized with the objective to investigate an involvement of Ang II in reproductive disturbances induced by obesity in females. In this manner, the aim of this study was to evaluate the effect of early AT₁ receptor blockade in obese females submitted to cafeteria diet intake since weaning on the onset of puberty, estrous cycle regularity, sexual behavior, ovulation rates in estrus morning and the profile of estradiol, progesterone, LH and prolactin in the proestrus afternoon.

Materials and Methods

Pregnant Wistar rats were obtained from the colony of UNIOESTE and housed in the animal room in our laboratory. Approximately 7 days before delivery, the females were housed individually and the presence of pups was checked twice a day. On the day of birth (Day 0), the number of pups was culled to 8 per dam by randomly removing some of them with minimal contact with remaining pups and the dam. After weaning (postnatal day 21) the female pups were housed in same groups of 3-5 per cage (41 cm long X 34 cm wide X 17 cm high). All rats were maintained on a 12-h light-dark cycle (lights on from 0700 to 1900 h) and the room temperature at $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Two dietary experimental groups were used: a) control group (CTL), that fed a standard rodent chow (12.39 kJ/g- NutrilabTM, Colombo, Brazil) and water; and b) cafeteria group (CAF), that fed cafeteria diet (22.76 kJ/g) adapted from a previous study (Prada *et al.* 2005) and received a pellet made of 37.5 % standard rodent chow, 25 % peanuts, 25 % chocolate, and 12.5 % cookies, offered together with palatable food items comprising wafer, snacks, cakes and biscuits, and water as well as soft drinks alternated daily (PepsiTM and Guaraná AntarcticaTM). The diets were offered daily at the same time (1230 to 1330 h) and the rats had access any time to all diet components in excess. Each day, leftovers were collected and replaced with new items. Body weight (alternate days) and food intake (daily) were monitored. Food intake were calculated as intake per day per rat, dividing the total intake by the number of the rats in the cage. After approximately 60 days of cafeteria feeding, the rats were killed and body weight, perigonadal and retroperitoneal fat pads weights were measured. Experiments were performed in accordance with the National Institutes of Health (NIH) guidelines and were approved by the University Research Committee.

Losartan administration

At weaning, intraperitoneal (*ip*) administration of Losartan (10 mg/kg) (Donadio *et al.* 2007) was realized daily at the same time of day. To control group of Losartan injection *ip* saline solution (0,9%) was daily administered at the same time of day.

Onset of puberty, estrous cycle and number of oocytes

Since 22th day of age, vaginal opening was verified daily in all females of both groups to detect the onset of puberty. After 70th day of age, vaginal smears were taken daily at 0900 h and analyzed under the microscope and the mean frequency of diestrus, metestrus, proestrus and estrus was compared between the groups. On the estrus morning (0900 h), animals that had their blood collected for hormone assay on the previous day were decapitated, the ovaries were removed and the oviduct was dissected and squashed between 2 glass slides. The number of oocytes of both oviduct ampullae was counted under the microscope (Zeiss, Goettingen, Germany) with a 2.5 X lens.

Female sexual behavior

On the proestrus night, virgin female rats aged 85 days were tested with a proven breeder male (not subjected to cafeteria diet or stimulation) in the observation cage (70 X 70 X 35 cm). During the dark period of the cycle (from 2000 to 2100 h), the rats were videotaped for 15 min, and the total number of mounts and lordosis was recorded. The index of female sexual receptiveness was calculated by dividing the number of lordosis by the number of mounts (Sodersten & Hansen 1977).

Intravenous glucose tolerance test (ivGTT)

For intravenous glucose tolerance test, blood samples were collected through jugular cannula inserted one day before the experiment and glucose and insulin levels (time 0) were measured in overnight fasted rats. A glucose load of 1.5 g/kg body weight was injected (*iv*) and additional blood samples were collected at 15, 30 and 60 min to measure blood glucose and plasma insulin. Blood glucose was measured using a glucose analyzer (AccuChek Advantage, Roche Diagnostic, Switzerland). To insulin assay, the blood samples were centrifuged at 3000 g for 15 min and plasma was separated and stored frozen at -20 °C for posterior measurement by RIA. The homeostatic model assessment (HOMA), an index of insulin

resistance, was calculated as $(G_0) \times (I_0)/22.5$, where G_0 is the fasting glucose level expressed as millimoles per liter, and I_0 is the fasting insulin level expressed as picomoles per liter (Santoro *et al.* 2004).

Triglycerides (TG) and cholesterol test

Food was withdrawn 12-14 h before the experiments and blood samples were taken for the determination of plasma concentration of total cholesterol, HDL, LDL and TG. Lipids were measured in a routine diagnostic analyzer (CHOD-PAP, cholesterol oxidase-peroxidase enzymatic colorimetric assay) and for TG (GPO-PAP, glycerol-3-phosphate oxidase enzymatic colorimetric assay).

Jugular cannulation and blood sampling

One day before the proestrus, between 1100 and 1200h, the animals groups (control and cafeteria) were submitted to jugular vein cannulation. The rats were anesthetized with tribromoethanol (Aldrich; 1 ml of a 2.5% solution/100 g body weight; *i.p.*) (Poletini *et al.* 2003), and a silastic cannula was inserted through the external jugular vein into the right atrium (Harms & Ojeda 1974). At time of experiment, a length of polyethylene tubing (PE-50) was connected to the jugular catheter, filled with heparinized saline (200 I.U. heparin/ml) and the rats allowed to remain undisturbed in their cages for additional 30 min until the beginning of the experiment. Blood samples (0.6 ml) were collected every hour (1300-1800 h) in the afternoon of proestrus in plastic heparinized syringes. After each blood sample was taken, 0.6 ml of 0.9% NaCl (saline) solution was injected to replace the volume removed. The blood samples were centrifuged at 3000 g for 15 min. Plasma was separated and stored frozen at -20 °C until assayed for estradiol, progesterone, LH, and prolactin by RIA.

RIA

Plasma estradiol and progesterone concentrations were determined by double-antibody RIA using specific Estradiol DSL – 4400 and Progesterone DSL – 3400 kits, respectively (Diagnostics Systems Laboratories, Texas, USA). The lower limit for detection was 7.5 pg/ml for estradiol and 0.34 ng/ml for progesterone. RIAs for LH, and prolactin were performed using specific kits provided by the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK; Baltimore, MD, USA). The antibodies used were anti-rat LH-S10 and PRL-S9; the standards were LH-RP3 and PRL-RP3. The lowest limit for detection was 0.04 ng/ml for LH and 0.19 ng/ml for PRL.

Statistical analysis

All values, excepting the number of oocytes were expressed as means \pm S.E.M. The significance of differences between groups and among the blood samples collected through-out the day was determined by two-way ANOVA with repeated measures followed by the Newman-Keuls test for multiple comparisons. The number of oocytes was expressed as a median (with interquartile range) and compared between the two groups by the Man-Whitney's *U* test. The level of significance was set as $P < 0.05$.

Results

Effects of losartan ip injection associated to cafeteria diet on food consumption, body weight evolution and retroperitoneal and perigonadal fat weights. The early-introduced cafeteria diet in adult female rats receiving saline was efficient to induce an improvement of the perigonadal ($P < 0.001$) and retroperitoneal ($P < 0.001$) fats weights in adulthood compared to chow fed diet rats. The analysis of body weight gain (figure 1) revealed that cafeteria diet fed rats receiving saline gained more body weight compared to those with standard laboratory chow receiving saline; this difference started to be evident after 27 days of cafeteria intake. Cafeteria fed females receiving losartan presented similar body weights evolution compared to that receiving saline. Food intake (figure 2) of cafeteria diet fed females was significantly lower in the large part of the control, and became higher than food intake of chow fed rats in the end of the experiment. However, in spite of the reduced food intake, the total energy intake per day was higher in cafeteria group and presented a further increase with the improvement in food intake in the end of the intake control compared to laboratory standard chow fed females. The AT₁ receptor blockade did not alter the food and energy intake in chow fed diet groups. However, when compared to cafeteria receiving saline, the cafeteria treated with losartan presented an improvement in food and, in consequence, in energy intake.

Effects of losartan ip injection associated to cafeteria diet on triglycerides and cholesterol levels and on glucose tolerance. Higher triglycerides and cholesterol LDL were presented by cafeteria diet fed females. (table 1). Total cholesterol was unchanged and cholesterol HDL was improved by cafeteria diet compared to chow fed rats. Indeed, cafeteria diet fed females manifested a diminished tolerance to a *iv* glucose challenge compared with their counterparts on the chow fed diet (figure 3). Although none of the rats was frankly diabetic, the cafeteria diet was associated with significantly higher fasting insulin levels. As indicated by the HOMA index of insulin sensitivity, the cafeteria diet fed females tended to be more insulin resistance than control females ($P < 0.0001$). Indeed, no differences in glucose tolerance and

HOMA index was evidenced in cafeteria group receiving losartan compared to cafeteria group receiving saline, showing that daily *ip* administration of losartan prevented the tendency to the insulin resistance development in cafeteria diet fed females in adulthood.

Effects of losartan ip injection associated to cafeteria diet on reproductive parameters.

Onset of puberty (figure 4). Cafeteria diet fed females receiving saline presented an anticipation of the vaginal opening compared to chow fed females receiving saline ($P = 0.007$). The AT₁ antagonist on cafeteria group did not promote alteration on the onset of puberty when compared to cafeteria fed group receiving saline ($P = 0.005$). However, the vaginal opening of cafeteria that received losartan was similar to chow fed females that received saline ($P = 0.379$), showing that AT₁ blockade avoid at least partially, the anticipation on the onset of puberty induced by cafeteria intake. No difference between vaginal opening of chow fed females were evidenced.

Ovarian weights, estrous cycle regularity and sexual behavior. The permanence on diestrus phase was increased by cafeteria diet, and was more prolonged by losartan administration in this group. No effect of losartan on estrous cycle regularity was evidenced in chow fed females. The metestrus, proestrus and estrus phases was not altered by cafeteria diet of AT₁ blockade. Additionally, losartan and cafeteria diet did not affect lordosis quotient and ovarian weights were reduced by cafeteria diet. Losartan associated with cafeteria diet prevented this reduction; whereas no difference was observed between chow fed rats and cafeteria fed ratas receiving losartan.

Ovulation rates (figure5). The ovulation rate was reduced by cafeteria diet intake. The number of oocytes counted in cafeteria diet fed females receiving saline was significantly lower ($P < 0.0001$) compared to chow fed females receiving saline. Oocytes counted from animals receiving losartan administration

associated to cafeteria diet, however, was higher than those receiving saline associated to cafeteria diet ($P < 0.0001$) and was not different from those receiving saline associated to chow fed diet ($P = 0.059$), showing that AT₁ blockade prevented the reduction in ovulation induced by the early intake of cafeteria diet. Similar ovulation rates were evidenced between chow fed animals receiving saline and losartan.

Steroids (figure 6), LH and prolactin (figure 7) levels in proestrus afternoon. Steroid hormone analysis of female rats plasma collected through the proestrus afternoon revealed no difference in estradiol (6A) of cafeteria diet compared to chow diet fed females receiving saline, in all times evaluated. Similarly, when estradiol levels in cafeteria group receiving saline was compared to those receiving losartan, no difference was evidenced. An increasing in estradiol levels at 1500 h in chow fed groups and at 1700 h in cafeteria receiving saline group and at 1600 h in cafeteria group receiving losartan. AUC analysis of estradiol (6B) evidenced no significant difference between groups. No significant effect for group ($F = 0.713$, $P = 0.545$) and for interaction among groups and time of day ($F = 1.115$, $P = 0.344$) were detected. A significant effect for time ($F = 2.868$, $P = 0.016$) were detected. Progesterone levels (6C) of chow fed rats receiving saline or losartan presented elevations at 1500 h compared to 1300, 1700 e 1800 h. No difference was evidenced in all times evaluated in cafeteria group receiving saline and in cafeteria fed females receiving losartan, higher concentrations were observed at 1700 h compared to the other times analysed. The AUC (C, $P < 0.0001$) analysis revealed no difference between the groups studied. Significant effects for group ($F = 8.903$, $P < 0.0001$) were detected. No significant effect for time of day ($F = 1.987$, $P = 0,081$) and for interaction between among groups and time of day ($F = 1.615$, $P = 0,071$) were detected.

LH plasma concentrations (7A) during the afternoon of the proestrus analysis revealed that chow fed females receiving saline or losartan presented an improvement in plasma concentrations at 1700 h, differing from all the other times evaluated. No elevation in plasma LH levels of cafeteria diet fed females receiving saline was observed. In cafeteria diet associated to losartan group, an improvement was

evidenced at 1800 h, showing that the antagonist of Angiotensin II AT₁ receptor reverted the inhibitory effect of cafeteria diet on LH surge in the proestrus afternoon. AUC (7B) analysis evidenced a reduction in LH levels of cafeteria diet fed females at 1700 h compared to chow diet fed rats. Significant effects for group ($F = 3.856$ $P = 0.010$), time of day ($F = 9.88$, $P < 0.0001$) and interaction among group and time of day ($F = 5.073$, $P < 0.0001$) were detected.

Prolactin plasma concentrations (7C) presented no differences in the times evaluated between all groups studied. At 1600 h, in all groups, the prolactin levels presented an improvement, reaching values significantly elevated at 1700 and 1800 h in cafeteria group associated to losartan administration compared to 1300 and 1400 h, and at 1700 h in chow fed diet females receiving saline compared to the other times. No difference was evidenced on plasma levels of prolactin in chow fed females and cafeteria diet fed rats between the times analysed. No significant effect for group ($F = 1.505$, $P = 0.2140$) and interaction among group and time of day ($F = 0.493$, $P = 0.943$) were detected. A significant effect for time of day was detected ($F = 6.988$, $P < 0.0001$). AUC (7D) did not evidence significant difference among groups.

Discussion

In this study, we describe the onset of puberty as well as the profile of ovarian steroids, LH and prolactin levels in the proestrus afternoon, the number of oocytes in estrus morning and sexual behavior in cafeteria dietary-induced obesity female rats receiving losartan *ip* administration. Like in our results, the deleterious effects of obesity on female reproductive physiology has been studied for many years (Frisch & McArthur 1974; Schroeder *et al.* 2009). Corroborating with these data, we previously reported negative effects of cafeteria dietary-induced obesity in reproductive parameters of female rats. However, no data regarding Ang II as a potential factor involved in the reduction in reproductive parameters in obese females are available thus far. Some studies have shown that Ang II is involved in the regulation of hypothalamus-pituitary axis activity (Steele *et al.* 1981; Steele *et al.* 1982; Steele *et al.* 1983; 1985; Steele 1987; Steele *et al.* 1992) and evidences support a strong relationship between renin-angiotensin system and obesity (Rincon-Choles *et al.* 2002; Engeli *et al.* 2003; Goossens *et al.* 2003). Thus, in the present study, we hypothesized that Ang II, through its AT1 receptors, is one of the factors that contributes and/or mediates the reproductive alterations induced by obesity in female rats.

Confirming data obtained in previous studies (Sclafani & Springer 1976; Kretschmer *et al.* 2005), cafeteria diet-fed female rats receiving saline presented higher energy intake than chow-fed rats receiving saline in all the experimental control, although a reduced food intake was evidenced in cafeteria group in most part of the experimental protocol compared to chow-fed rats. In consequence of the intake of high calories by cafeteria diet-fed females, we observed increased fat pads weights in this group compared to chow-fed females. The administration of losartan associated to cafeteria diet promoted an increase in food and energy intake compared to cafeteria diet-fed females receiving saline. Considering that central Ang II improves food intake in rats (Porter *et al.* 2003) and that losartan and its active metabolite EXP3174 (Wong *et al.* 1990) cross over the blood brain barrier (Fregly & Rowland 1991; Song *et al.* 1991; Li *et al.* 1993; Zhuo *et al.* 1994; Polidori *et al.* 1996; Polidori *et al.* 1998; Culman *et al.* 1999; Wang *et al.* 2003), it is possible that *ip* losartan injection blocked the inhibitory effects of central Ang II on food intake.

Furthermore, no difference was evidenced between retroperitoneal and perigonadal weights of cafeteria diet-fed rats receiving losartan and chow-fed rats receiving saline. In fact, losartan treatment induces a reduction on adiposity in diabetic mice (Tomono *et al.* 2008). However, reduced fat storage in our results was accompanied by the improvement on food and energy intake in cafeteria diet-fed females receiving losartan, showing an inhibitory effect of losartan in fat storage, even when the intake of food rich in calories was increased.

As expected, cafeteria diet promoted an insulin resistance in the female rats, as shown by HOMA analysis, and that association of losartan with cafeteria diet forewarned the insulin resistance occurrence. In this regard, it has been demonstrated that Ang II is related to a reduction on insulin signaling (Lastra *et al.* 2006), through the AT₁ receptor (Machado *et al.* 1998; Lau *et al.* 2004) and that losartan administration reduces insulin resistance (Sharma *et al.* 2002; Pfeffer *et al.* 2003; Julius *et al.* 2004; Shiuchi *et al.* 2004; Kjeldsen *et al.* 2006)

We confirmed previous reports of the acceleration of the onset of puberty in obese females (Kennedy & Mitra 1963) demonstrated that the anticipation in vaginal opening induced by cafeteria diet intake was not altered by losartan injection. However, the onset of puberty of cafeteria diet-fed rats receiving losartan was not significantly different of chow-fed rats receiving saline, showing a tendency of Ang II to prevent the earlier onset of puberty induced by cafeteria diet intake. Considering that an increase in fats weights is associated with an advancement of the onset of puberty (Frisch & Revelle 1970; Frisch 1980), and that reduced fat pads weights presented by cafeteria-diet fed females at 30th days (date approximate to vaginal opening in rats) receiving losartan compared to cafeteria-diet fed females receiving saline, we could infer that the reduction of pads induced by losartan could be avoiding partially the anticipation of vaginal opening, and that Ang II through AT₁ receptors contributes to the precocious onset of puberty evidenced in cafeteria-fed females. In addition, it should be noted that, although losartan reduce fats weights in cafeteria diet-fed females, no difference was observed between these females and

chow-fed females, suggesting that its effects on the vaginal opening is proportionally to its effects in reduction of fat deposition.

A prolongation of diestrus phase was observed in cafeteria diet-fed females compared to chow-fed females, confirming prior studies (Innami *et al.* 1973; Glick *et al.* 1990). An additional increment in diestrus phase was promoted by losartan administration in cafeteria fed-females, showing that Ang II is contributing to avoid a higher improvement in diestrus phase induced by cafeteria diet intake.

No alteration was evidenced on female sexual behavior in our study in cafeteria diet- fed females, corroborating with previous results of our laboratory. Similarly, no difference among cafeteria diet-fed female rats receiving losartan and cafeteria diet-fed female rats receiving saline was observed. In physiology standings the blockade of Ang II receptors do not alter sexual behavior in female rats (Ceconello *et al.* 2010) and in male mice (Nomura *et al.* 2007) and in hipertension, no alteration on sexual behavior was evidenced in men (Chan *et al.* 1999) and in male rats (Ferrario *et al.* 1998) treated with losartan. In contrast, in type II diabetes male mice, the blockade of AT₁ receptors improves sexual behavior (Nomura *et al.* 2007) and reports revealed that in women after menopause a higher libido is induced by AT₁ receptor blockade (Derosa *et al.* 2003).

In the analysis of the number of oocytes counted in the ovaries, a reduced number of oocytes in cafeteria group receiving saline compared to chow-fed group receiving saline was evidenced. This finding is consistent with previous results obtained in our laboratory, and that corroborates with data in overweight and obese women (Mitchell & Rogers 1953; Hartz *et al.* 1979; Friedman & Kim 1985; Norman & Clark 1998; Bolumar *et al.* 2000). Surprisingly, losartan administration promoted an increase in the number of oocytes counted in cafeteria diet – fed females compared to cafeteria-fed females receiving saline and no significant difference was observed among cafeteria diet – fed females receiving saline and chow-fed females receiving saline or losartan. In this manner, the blockade of AT₁ receptors normalized the ovulation rates and prevented the reduction in ovulation induced by cafeteria diet.

The normalization of the number of oocytes in estrus morning in cafeteria diet-fed females, probably is due to the reestablish of LH and progesterone surges on proestrus afternoon by losartan administration. Studies reported that antral and preovulatory follicles and the number of dams are reduced in transgenic rats (mRen-2) that overexpress renin and angiotensin and that the infusion of Ang II in rats is associated with the reduction in antral and preovulatory follicles (de Gooyer *et al.* 2004). Considering that, in obesity the activity of renin-angiotensin system is increased (Licata *et al.* 1994; Umemura *et al.* 1997; Goodfriend *et al.* 1999), that a reduced follicle development is observed in obese female mice (Tortoriello *et al.* 2004), and that progesterone levels were not improved in the proestrus afternoon in cafeteria diet-fed females, we could infer that a reduction in ovarian follicles could be induced by higher levels of Ang II, that could be reducing the synthesis and secretion of follicle-derived progesterone and the LH surge and, in consequence, reducing the number of oocytes counted in these females.

In contrast with the beneficial effects of losartan on ovulation in cafeteria diet-fed females revealed in our results, studies have shown an inhibition of ovulation associated to Ang II receptors blockers, like in immature female rats with induced ovulation (Pellicer *et al.* 1988) and in rabbits ovaries perfused *in vitro* (Yoshimura *et al.* 1992). Indeed, the *icv* administration of saralasin, an Ang II receptor antagonist and of enalapril, an inhibitor of Ang II synthesis, inhibit the LH surge and ovulation in female rats when administered in the morning of proestrus day (Steele *et al.* 1983). However, differing from our work, these studies were not realized and did not evaluate obese rats. However, differing from our study, these studies were not realized in obese females and the ovarian steroid levels of the females studied were not altered. Ang II effect on LH secretion is dependent of estradiol and progesterone. In ovariectomized rats treated with estradiol and progesterone, Ang II stimulates LH secretion (Steele *et al.* 1985), that could explain the inhibitory effect of Ang II antagonists on preovulatory LH surge in these females. On the other hand, in ovariectomized rats with no ovarian steroids replacement, Ang II inhibits the pulsatile secretion of LH. Thus, the absence of progesterone improvement in the proestrus afternoon in cafeteria diet – fed females in the present study, in spite of the similar estradiol levels observed in these females

compared to chow-fed females, could be inducing similar effects to that evidenced in females without estradiol and progesterone, inhibiting the increasing in LH levels in obese females, considering that the blockade of AT₁ receptors by losartan reestablished the preovulatory LH surge in these females.

Additionally, a previous study revealed the absence of Ang II receptors in the preovulatory follicles membrane with LH receptors (Daud *et al.* 1988), discarding an direct action of plasma Ang II on ovaries. However, other study evidenced Ang II receptors inside the ovarian cells, indicating that Ang II produced locally could influence the ovulatory function. Indeed, the preovulatory LH surge promotes an increase in Ang II in preovulatory follicles (Lightman *et al.* 1987), and Ang II stimulates prostaglandins synthesis in ovary (Peterson *et al.* 1993; Yoshimura *et al.* 1993), that induces the rupture and oocyte extrusion by the ovaries (Espey 1992). Altogether, these data led us to infer that the absence of LH surge in the proestrus afternoon of cafeteria diet – fed females, could be inhibiting the ovarian production of Ang II and, in consequence, of prostaglandins and contribution to reduce ovulation rates in these females. The reestablishment of preovulatory LH surge induce by *ip* injection of losartan, in this manner, could be stimulating the intrafollicular Ang II and thereafter, the prostaglandins synthesis, reestablishing ovulation in cafeteria diet – induced obesity in female rats.

We have to consider, naturally that the positive effects of losartan in the preovulatory LH and progesterone and in the ovulation rates in obese females could be indirectly due to the improvement in general physiologic state promoted by AT₁ receptors blockade, including its prevention effects on body fat pad weights, on insulin resistance and on the increased triglycerides and LDL cholesterol. In fact, reports that demonstrated a reestablishment of reproductive parameters impaired by the reduction in body fat (Kiddy *et al.* 1992; Hoeger 2001; Norman *et al.* 2002), through the increase in the endocrine and metabolic functions (Holte *et al.* 1995; Zamorano *et al.* 1997; Esposito *et al.* 2003). As a consequence, reduced hyperandrogenism and improved menstrual function, ovulation and fertility (Kiddy *et al.* 1992; Zamorano *et al.* 1997), as well as increased levels of steroid binding globulins (Guzick *et al.* 1994) are observed in women.

In summary, we have confirming previous reports of improved storage of fat, impaired glucose tolerance and higher triglycerides and LDL cholesterol in female rats induced by the early intake of cafeteria diet, and that these metabolic alterations promotes a delay in the onset of puberty, a prolongation of diestrus phase, as well as a reduction in the ovulation in estrus morning and in the preovulatory LH and progesterone surges in proestrus afternoon. In this study, we demonstrated that Ang II through its AT₁ receptors seems to avoid an additional prolongation of diestrus phase and do not alter sexual behavior in obese female rats. We also demonstrated that the daily *ip* administration of losartan associated to cafeteria diet intake avoid the improvement in fat pads, in triglycerides and LDL cholesterol and in the insulin resistance development. In addition, losartan prevented the deleterious consequences of obesity on the reproductive parameters analyzed; in this manner, normal range of ovulation as well as LH and progesterone surges were evidenced in cafeteria diet-fed females receiving losartan. Thus, these data evidence the peptide Ang II as an important factor involved in the consequences of obesity on the reproductive function in female rats and raises a new factor as a target of study to better understand the complex mechanisms involved in endocrine and/or behavioral responses of females reproductive system in obesity.

Acknowledgments

Acknowledgments: This study was supported by grants from the Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná/ SETI, CNPq and FAPESP. We are very grateful to Unioeste, UFRGS, USP and UNICAMP.

References

- Barker DJ 2007 Obesity and early life. *Obes Rev* **8 Suppl 1** 45-49.
- Bolumar F, Olsen J, Rebagliato M, Saez-Lloret I & Bisanti L 2000 Body mass index and delayed conception: a European Multicenter Study on Infertility and Subfecundity. *Am J Epidemiol* **151** 1072-1079.
- Brands MW & Hall JE 1992 Insulin resistance, hyperinsulinemia, and obesity-associated hypertension. *J Am Soc Nephrol* **3** 1064-1077.
- Chan P, Liu JC, Tong YC, Chen YJ, Wang CC, Tomlinson B & Cheng JT 1999 Effects of losartan on the sexual behavior of male rats. *Pharmacology* **58** 132-139.
- Culman J, von Heyer C, Piepenburg B, Rascher W & Unger T 1999 Effects of systemic treatment with irbesartan and losartan on central responses to angiotensin II in conscious, normotensive rats. *Eur J Pharmacol* **367** 255-265.
- Daud AI, Bumpus FM & Husain A 1988 Evidence for selective expression of angiotensin II receptors on atretic follicles in the rat ovary: an autoradiographic study. *Endocrinology* **122** 2727-2734.
- de Gooyer TE, Skinner SL, Wlodek ME, Kelly DJ & Wilkinson-Berka JL 2004 Angiotensin II influences ovarian follicle development in the transgenic (mRen-2)²⁷ and Sprague-Dawley rat. *J Endocrinol* **180** 311-324.
- DeFronzo RA & Ferrannini E 1991 Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* **14** 173-194.
- Derosa G, Mugellini A, Ciccarelli L & Fogari R 2003 Randomized, double-blind, placebo-controlled comparison of the action of orlistat, fluvastatin, or both on anthropometric measurements, blood pressure, and lipid profile in obese patients with hypercholesterolemia prescribed a standardized diet. *Clin Ther* **25** 1107-1122.
- Donadio MV, Kunrath A, Corezola KL, Franci CR, Anselmo-Franci JA, Lucion AB & Sanvitto GL 2007 Effects of acute stress on the day of proestrus on sexual behavior and ovulation in female rats: participation of the angiotensinergic system. *Physiol Behav* **92** 591-600.
- Engeli S, Schling P, Gorzelniak K, Boschmann M, Janke J, Ailhaud G, Teboul M, Massiera F & Sharma AM 2003 The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *Int J Biochem Cell Biol* **35** 807-825.
- Espey LL 1992 A review of factors that could influence membrane potentials of ovarian follicular cells during mammalian ovulation. *Acta Endocrinol (Copenh)* **126 Suppl 2** 1-31.
- Esposito K, Pontillo A, Di Palo C, Giugliano G, Masella M, Marfella R & Giugliano D 2003 Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *Jama* **289** 1799-1804.
- Fedorcsak P, Dale PO, Storeng R, Tanbo T & Abyholm T 2001 The impact of obesity and insulin resistance on the outcome of IVF or ICSI in women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* **16** 1086-1091.
- Ferrario CM, Chappell MC, Dean RH & Iyer SN 1998 Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function, and natriuresis. *J Am Soc Nephrol* **9** 1716-1722.
- Fregly MJ & Rowland NE 1991 Effect of a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, DuP 753, on angiotensin-related water intake in rats. *Brain Res Bull* **27** 97-100.
- Friedman CI & Kim MH 1985 Obesity and its effect on reproductive function. *Clin Obstet Gynecol* **28** 645-663.
- Frisch RE 1980 Pubertal adipose tissue: is it necessary for normal sexual maturation? Evidence from the rat and human female. *Fed Proc* **39** 2395-2400.
- Frisch RE & McArthur JW 1974 Menstrual cycles: fatness as a determinant of minimum weight for height necessary for their maintenance or onset. *Science* **185** 949-951.

- Frisch RE & Revelle R 1970 Height and weight at menarche and a hypothesis of critical body weights and adolescent events. *Science* **169** 397-399.
- Giacchetti G, Faloia E, Mariniello B, Sardu C, Gatti C, Camilloni MA, Guerrieri M & Mantero F 2002 Overexpression of the renin-angiotensin system in human visceral adipose tissue in normal and overweight subjects. *Am J Hypertens* **15** 381-388.
- Glick Z, Yamini S, Lupien J & Sod-Moriah U 1990 Estrous cycle irregularities in overfed rats. *Physiol Behav* **47** 307-310.
- Goodfriend TL, Kelley DE, Goodpaster BH & Winters SJ 1999 Visceral obesity and insulin resistance are associated with plasma aldosterone levels in women. *Obes Res* **7** 355-362.
- Goossens GH, Blaak EE & van Baak MA 2003 Possible involvement of the adipose tissue renin-angiotensin system in the pathophysiology of obesity and obesity-related disorders. *Obes Rev* **4** 43-55.
- Guzick DS, Wing R, Smith D, Berga SL & Winters SJ 1994 Endocrine consequences of weight loss in obese, hyperandrogenic, anovulatory women. *Fertil Steril* **61** 598-604.
- Harms PG & Ojeda SR 1974 A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. *J Appl Physiol* **36** 391-392.
- Hartz AJ, Barboriak PN, Wong A, Katayama KP & Rimm AA 1979 The association of obesity with infertility and related menstrual abnormalities in women. *Int J Obes* **3** 57-73.
- Hoeger K 2001 Obesity and weight loss in polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol Clin North Am* **28** 85-97, vi-vii.
- Holte J, Bergh T, Berne C, Wide L & Lithell H 1995 Restored insulin sensitivity but persistently increased early insulin secretion after weight loss in obese women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **80** 2586-2593.
- Hotchkiss J; Knobil E 1994 In: *The menstrual cycle and its neuroendocrine control.*, pp. New York: Knobil & Neill.
- Husain A, Bumpus FM, De Silva P & Speth RC 1987 Localization of angiotensin II receptors in ovarian follicles and the identification of angiotensin II in rat ovaries. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** 2489-2493.
- Innami S, Yang MG, Mickelsen O & Hafs HD 1973 The influence of high-fat diets on estrous cycles, sperm production and fertility of rats. *Proc Soc Exp Biol Med* **143** 63-68.
- Julius S, Kjeldsen SE, Weber M, Brunner HR, Ekman S, Hansson L, Hua T, Laragh J, McInnes GT, Mitchell L, Plat F, Schork A, Smith B & Zanchetti A 2004 Outcomes in hypertensive patients at high cardiovascular risk treated with regimens based on valsartan or amlodipine: the VALUE randomised trial. *Lancet* **363** 2022-2031.
- Kennedy GC & Mitra J 1963 Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat. *J Physiol* **166** 408-418.
- Kiddy DS, Hamilton-Fairley D, Bush A, Short F, Anyaoku V, Reed MJ & Franks S 1992 Improvement in endocrine and ovarian function during dietary treatment of obese women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* **36** 105-111.
- Kjeldsen SE, Julius S, Mancia G, McInnes GT, Hua T, Weber MA, Coca A, Ekman S, Girerd X, Jamerson K, Larochelle P, MacDonald TM, Schmieder RE, Schork MA, Stolt P, Viskoper R, Widimsky J & Zanchetti A 2006 Effects of valsartan compared to amlodipine on preventing type 2 diabetes in high-risk hypertensive patients: the VALUE trial. *J Hypertens* **24** 1405-1412.
- Kretschmer BD, Schelling P, Beier N, Liebscher C, Treutel S, Kruger N, Scholz HP & Haus A 2005 Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. *Life Sci* **76** 1553-1573.
- Lastra G, Manrique C, McFarlane SI & Sowers JR 2006 Cardiometabolic syndrome and chronic kidney disease. *Curr Diab Rep* **6** 207-212.
- Lau T, Carlsson PO & Leung PS 2004 Evidence for a local angiotensin-generating system and dose-dependent inhibition of glucose-stimulated insulin release by angiotensin II in isolated pancreatic islets. *Diabetologia* **47** 240-248.

- Li Z, Bains JS & Ferguson AV 1993 Functional evidence that the angiotensin antagonist losartan crosses the blood-brain barrier in the rat. *Brain Res Bull* **30** 33-39.
- Licata G, Scaglione R, Ganguzza A, Corrao S, Donatelli M, Parrinello G, Dichiara MA, Merlino G & Cecala MG 1994 Central obesity and hypertension. Relationship between fasting serum insulin, plasma renin activity, and diastolic blood pressure in young obese subjects. *Am J Hypertens* **7** 314-320.
- Lightman A, Tarlatzis BC, Rzasz PJ, Culler MD, Caride VJ, Negro-Vilar AF, Lennard D, DeCherney AH & Naftolin F 1987 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* **156** 808-816.
- Lintsen AM, Pasker-de Jong PC, de Boer EJ, Burger CW, Jansen CA, Braat DD & van Leeuwen FE 2005 Effects of subfertility cause, smoking and body weight on the success rate of IVF. *Hum Reprod* **20** 1867-1875.
- Machado LJ, Marubayashi U, Reis AM & Coimbra CC 1998 The hyperglycemia induced by angiotensin II in rats is mediated by AT1 receptors. *Braz J Med Biol Res* **31** 1349-1352.
- Micevych P, Sinchak K, Mills RH, Tao L, LaPolt P & Lu JK 2003 The luteinizing hormone surge is preceded by an estrogen-induced increase of hypothalamic progesterone in ovariectomized and adrenalectomized rats. *Neuroendocrinology* **78** 29-35.
- Miller J, Rosenbloom A & Silverstein J 2004 Childhood obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **89** 4211-4218.
- Mitchell GW, Jr. & Rogers J 1953 The influence of weight reduction on amenorrhea in obese women. *N Engl J Med* **249** 835-837.
- Mundy AL, Haas E, Bhattacharya I, Widmer CC, Kretz M, Hofmann-Lehmann R, Minotti R & Barton M 2007 Fat intake modifies vascular responsiveness and receptor expression of vasoconstrictors: implications for diet-induced obesity. *Cardiovasc Res* **73** 368-375.
- Nomura M, Nishii H, Ozaki Y, Fujimoto N & Matsumoto T 2007 An angiotensin II receptor blocker increases sexual behavior in type 2 diabetic mice. *Physiol Behav* **91** 223-228.
- Norman RJ & Clark AM 1998 Obesity and reproductive disorders: a review. *Reprod Fertil Dev* **10** 55-63.
- Norman RJ, Davies MJ, Lord J & Moran LJ 2002 The role of lifestyle modification in polycystic ovary syndrome. *Trends Endocrinol Metab* **13** 251-257.
- Ogden CL, Yanovski SZ, Carroll MD & Flegal KM 2007 The epidemiology of obesity. *Gastroenterology* **132** 2087-2102.
- Pellicer A, Palumbo A, DeCherney AH & Naftolin F 1988 Blockage of ovulation by an angiotensin antagonist. *Science* **240** 1660-1661.
- Peterson CM, Morioka N, Zhu C, Ryan JW & LeMaire WJ 1993 Angiotensin-converting enzyme inhibitors have no effect on ovulation and ovarian steroidogenesis in the perfused rat ovary. *Reprod Toxicol* **7** 131-135.
- Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Held P, McMurray JJ, Michelson EL, Olofsson B, Ostergren J, Yusuf S & Pocock S 2003 Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-Overall programme. *Lancet* **362** 759-766.
- Phillips MI, Wang H, Kimura B, Rejtman M, Koduri P & Kalra SP 1993 Dynamic changes in hypothalamic angiotensin II levels and release in association with progesterone-induced luteinizing hormone surge. *Endocrinology* **132** 1637-1642.
- Phillips MI, Wang H, Kimura B, Speth RC & Ghazi N 1995 Brain angiotensin and the female reproductive cycle. *Adv Exp Med Biol* **377** 357-370.
- Poletini MO, Szawka RE, Freitas Marcon RM, Veiga MD, Franci CR & Anselmo-Franci JA 2003 A method to study preovulatory surges of gonadotropins. *Brain Res Brain Res Protoc* **12** 41-48.
- Polidori C, Ciccocioppo R, De Caro G & Massi M 1998 Further evidence that central tachykinin NK-1 receptors mediate the inhibitory effect of tachykinins on angiotensin-induced drinking in rats. *Peptides* **19** 149-155.

- Polidori C, Ciccocioppo R, Pompei P, Cirillo R & Massi M 1996 Functional evidence for the ability of angiotensin AT1 receptor antagonists to cross the blood-brain barrier in rats. *Eur J Pharmacol* **307** 259-267.
- Porter JP, Anderson JM, Robison RJ & Phillips AC 2003 Effect of central angiotensin II on body weight gain in young rats. *Brain Res* **959** 20-28.
- Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, Corezola do Amaral ME, Hoer NF, Boschero AC & Saad MJ 2005 Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology* **146** 1576-1587.
- Rajendren G & Moss RL 1993 The role of the medial nucleus of amygdala in the mating-induced enhancement of lordosis in female rats: the interaction with luteinizing hormone-releasing hormone neuronal system. *Brain Res* **617** 81-86.
- Rincon-Choles H, Kasinath BS, Gorin Y & Abboud HE 2002 Angiotensin II and growth factors in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* S8-11.
- Santoro N, Lasley B, McConnell D, Allsworth J, Crawford S, Gold EB, Finkelstein JS, Greendale GA, Kelsey J, Korenman S, Luborsky JL, Matthews K, Midgley R, Powell L, Sabatine J, Schocken M, Sowers MF & Weiss G 2004 Body size and ethnicity are associated with menstrual cycle alterations in women in the early menopausal transition: The Study of Women's Health across the Nation (SWAN) Daily Hormone Study. *J Clin Endocrinol Metab* **89** 2622-2631.
- Schroeder M, Zagoory-Sharon O, Shbiro L, Marco A, Hyun J, Moran TH, Bi S & Weller A 2009 Development of obesity in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **297** R1749-1760.
- Sclafani A & Springer D 1976 Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiol Behav* **17** 461-471.
- Sharma AM, Janke J, Gorzelniak K, Engeli S & Luft FC 2002 Angiotensin blockade prevents type 2 diabetes by formation of fat cells. *Hypertension* **40** 609-611.
- Shiuchi T, Iwai M, Li HS, Wu L, Min LJ, Li JM, Okumura M, Cui TX & Horiuchi M 2004 Angiotensin II type-1 receptor blocker valsartan enhances insulin sensitivity in skeletal muscles of diabetic mice. *Hypertension* **43** 1003-1010.
- Smith MS, Freeman ME & Neill JD 1975 The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* **96** 219-226.
- Sodersten P & Hansen S 1977 Effects of oestradiol and progesterone on the induction and duration of sexual receptivity in cyclic female rats. *J Endocrinol* **74** 477-485.
- Song K, Allen AM, Paxinos G & Mendelsohn FA 1991 Angiotensin II receptor subtypes in rat brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **18** 93-96.
- Steele MK 1987 Effects of angiotensins injected into various brain areas on luteinizing hormone release in female rats. *Neuroendocrinology* **46** 401-405.
- Steele MK, Gallo RV & Ganong WF 1983 A possible role for the brain renin-angiotensin system in the regulation of LH secretion. *Am J Physiol* **245** R805-810.
- Steele MK, Gallo RV & Ganong WF 1985 Stimulatory or inhibitory effects of angiotensin II upon LH secretion in ovariectomized rats: a function of gonadal steroids. *Neuroendocrinology* **40** 210-216.
- Steele MK, McCann SM & Negro-Vilar A 1982 Modulation by dopamine and estradiol of the central effects of angiotensin II on anterior pituitary hormone release. *Endocrinology* **111** 722-729.
- Steele MK, Negro-Vilar A & McCann SM 1981 Effect of angiotensin II on in vivo and in vitro release of anterior pituitary hormones in the female rat. *Endocrinology* **109** 893-899.
- Steele MK, Stephenson KN, Meredith JM & Levine JE 1992 Effects of angiotensin II on LHRH release, as measured by in vivo microdialysis of the anterior pituitary gland of conscious female rats. *Neuroendocrinology* **55** 276-281.

- Tomono Y, Iwai M, Inaba S, Mogi M & Horiuchi M 2008 Blockade of AT1 receptor improves adipocyte differentiation in atherosclerotic and diabetic models. *Am J Hypertens* **21** 206-212.
- Tortoriello DV, McMinin J & Chua SC 2004 Dietary-induced obesity and hypothalamic infertility in female DBA/2J mice. *Endocrinology* **145** 1238-1247.
- Umemura S, Nyui N, Tamura K, Hibi K, Yamaguchi S, Nakamaru M, Ishigami T, Yabana M, Kihara M, Inoue S & Ishii M 1997 Plasma angiotensinogen concentrations in obese patients. *Am J Hypertens* **10** 629-633.
- Wang JM, Tan J & Leenen FH 2003 Central nervous system blockade by peripheral administration of AT1 receptor blockers. *J Cardiovasc Pharmacol* **41** 593-599.
- Weiss R, Dziura J, Burgert TS, Tamborlane WV, Taksali SE, Yeckel CW, Allen K, Lopes M, Savoye M, Morrison J, Sherwin RS & Caprio S 2004 Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *N Engl J Med* **350** 2362-2374.
- Wong PC, Price WA, Chiu AT, Duncia JV, Carini DJ, Wexler RR, Johnson AL & Timmermans PB 1990 Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. VIII. Characterization of functional antagonism displayed by DuP 753, an orally active antihypertensive agent. *J Pharmacol Exp Ther* **252** 719-725.
- Wu TJ, Glucksman MJ, Roberts JL & Mani SK 2006 Facilitation of lordosis in rats by a metabolite of luteinizing hormone releasing hormone. *Endocrinology* **147** 2544-2549.
- Yoshimura Y, Karube M, Koyama N, Shiokawa S, Nanno T & Nakamura Y 1992 Angiotensin II directly induces follicle rupture and oocyte maturation in the rabbit. *FEBS Lett* **307** 305-308.
- Yoshimura Y, Karube M, Oda T, Koyama N, Shiokawa S, Akiba M, Yoshinaga A & Nakamura Y 1993 Locally produced angiotensin II induces ovulation by stimulating prostaglandin production in in vitro perfused rabbit ovaries. *Endocrinology* **133** 1609-1616.
- Zamorano PL, Mahesh VB, De Sevilla LM, Chorich LP, Bhat GK & Brann DW 1997 Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. *Neuroendocrinology* **65** 223-228.
- Zhuo J, Song K, Abdelrahman A & Mendelsohn FA 1994 Blockade by intravenous losartan of AT1 angiotensin II receptors in rat brain, kidney and adrenals demonstrated by in vitro autoradiography. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **21** 557-567.
- Zorad S, Fickova M, Zelezna B, Macho L & Kral JG 1995 The role of angiotensin II and its receptors in regulation of adipose tissue metabolism and cellularity. *Gen Physiol Biophys* **14** 383-391.

Figure Legends

Figure 1. Body weigh evolution of female rats of cafeteria diet and saline (CAF + SAL) or losartan (CAF+LOS) and chow diet and saline (CTL+SAL) or losartan (CTL+LOS) female rats. All values are expressed as the means \pm SEM. *, $P < 0.05$ for CAF + SAL *versus* CTL + SAL; **, $P < 0.05$ for CAF + LOS *versus* CAF + SAL.

Figure 2. Food and energy intakes of cafeteria diet and saline (CAF + SAL) or losartan (CAF+LOS) and chow diet and saline (CTL+SAL) or losartan (CTL+LOS) female rats. All values are expressed as the means \pm SEM. * $P < 0.05$ for food intake of CAF + SAL *versus* CTL + SAL; ** $P < 0.05$ for food intake of CAF + LOS *versus* CAF + SAL; # $P < 0.05$ for energy intake of CAF + SAL *versus* CTL + SAL; ## $P < 0.05$ for energy intake of CAF + LOS *versus* CAF + SAL.

Figure 3. Blood glucose (A) and plasma insulin (B) of sixty minutes of glucose tolerance testing in cafeteria diet (solid lines) and saline (CAF + SAL) or losartan (CAF+LOS) and chow diet (dotted lines) and saline (CTL+SAL) or losartan (CTL+LOS) female rats. All values are expressed as the means \pm SEM. *, $P < 0.05$ for CAF + SAL *versus* CTL + SAL; **, $P < 0.05$ for CAF + LOS *versus* CAF + SAL.

Figure 4. Onset of puberty (days) of cafeteria diet fed and saline (CAF+SAL) or losartan (CAF+LOS) and chow diet fed and saline (CTL+SAL) or losartan (CTL+LOS) female rats. Each bar is represented by the means \pm SEM. $P < 0.05$ was significance accepted.

Figure 5. Number of oocytes (means \pm SEM) of female rats on the day of estrus. Letters upon the bars represents no statistic difference between the following groups: cafeteria diet fed and saline (CAF+SAL - a) or losartan (CAF+LOS - b) female rats, and chow diet fed and saline (CTL+SAL - c) or losartan (CTL+LOS - d) female rats. $P < 0.05$ was significance accepted.

Figure 6. Plasma estradiol levels ((**A**) pg/mL), AUC of estradiol (**B**) and plasma progesterone levels ((**C**) pg/mL) and AUC of progesterone (**D**) in the afternoon of proestrus in adult cafeteria (CAF) and saline (CAF+SAL, $n = 12$) or losartan (CAF+LOS, $n = 08$) and chow diet and saline (CTL+SAL, , $n = 15$) or losartan (CTL+LOS, $n = 13$) fed female rats. Blood samples were collected at 1300, 1400, 1500, 1600, 1700 and 1800 h from a jugular catheter. Plasma hormone concentration and each bar are represented by the means \pm SEM. $P < 0.05$ was significance accepted.

Figure 7. Plasma LH levels ((**A**) pg/mL), AUC of LH (**B**), plasma prolactin levels ((**C**) pg/mL) and AUC of prolactin (**D**) in the afternoon of proestrus of adult cafeteria (CAF) and saline (CAF+SAL, $n = 12$) or losartan (CAF+LOS, $n = 08$) and chow diet and saline (CTL+SAL, , $n = 15$) or losartan (CTL+LOS, $n = 13$) fed female rats. Blood samples were collected at 1300, 1400, 1500, 1600, 1700 and 1800 h from a jugular catheter. Plasma hormone concentration and each bar are represented by the means \pm SEM. $P < 0.05$ was significance accepted.

Table 1. Nasoanal length and body, retroperitoneal and perigonadal fat pads weights and plasma TG, total cholesterol and HDL and LDL levels of the following groups: control + saline (CTL+SAL), cafeteria + saline (CAF+SAL), control + losartan (CTL+LOS) and cafeteria + losartan (CAF+LOS). $P < 0.05$ was significance accepted. The number of animals (n) is given in parentheses.

Figure 1

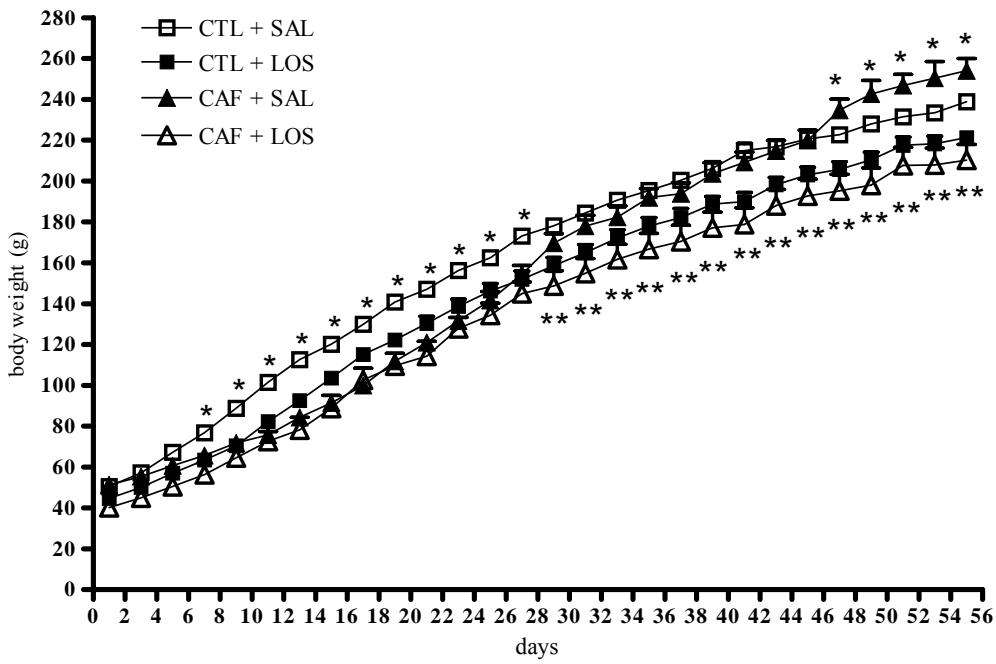


Figure 2

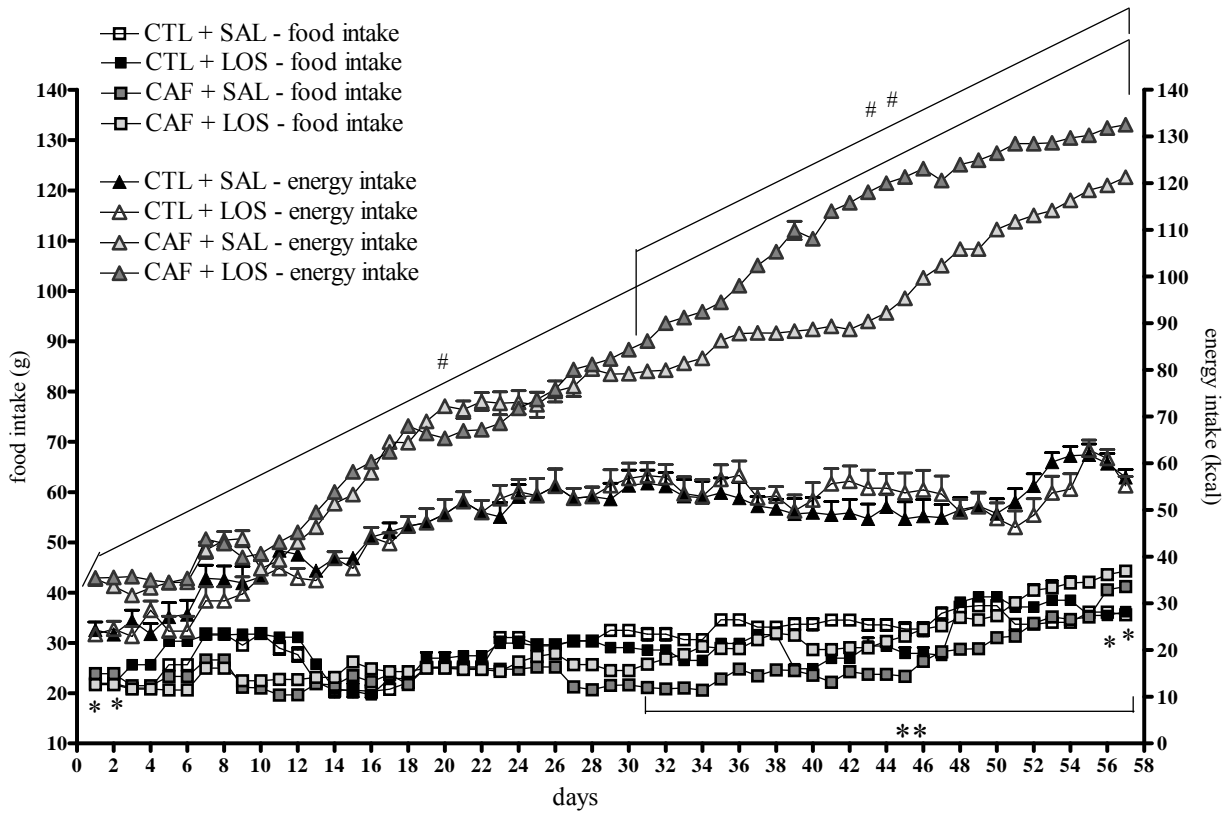


Figure 3

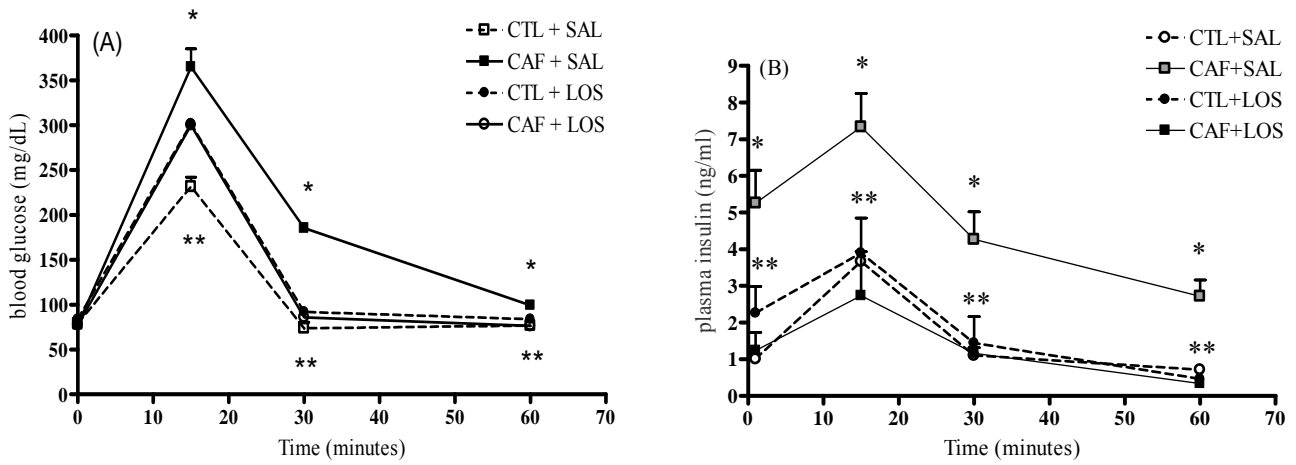


Figure 4

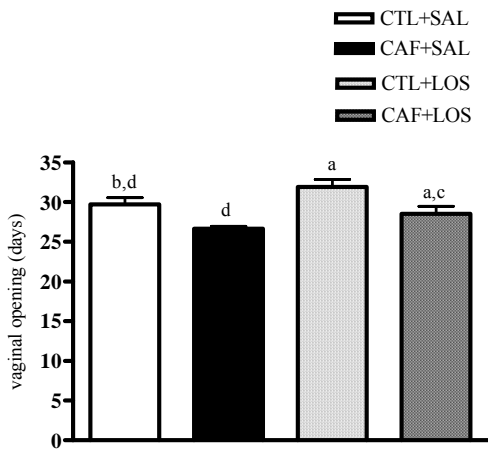


Figure 5

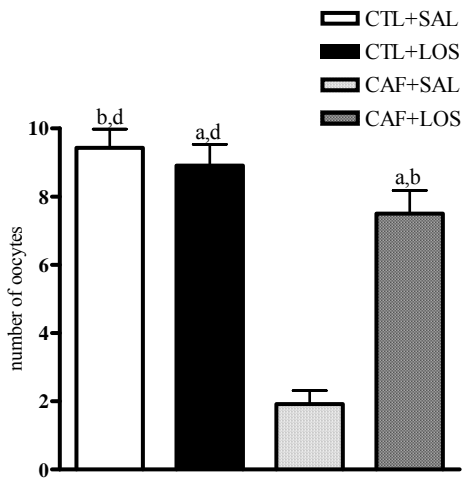


Figure 6

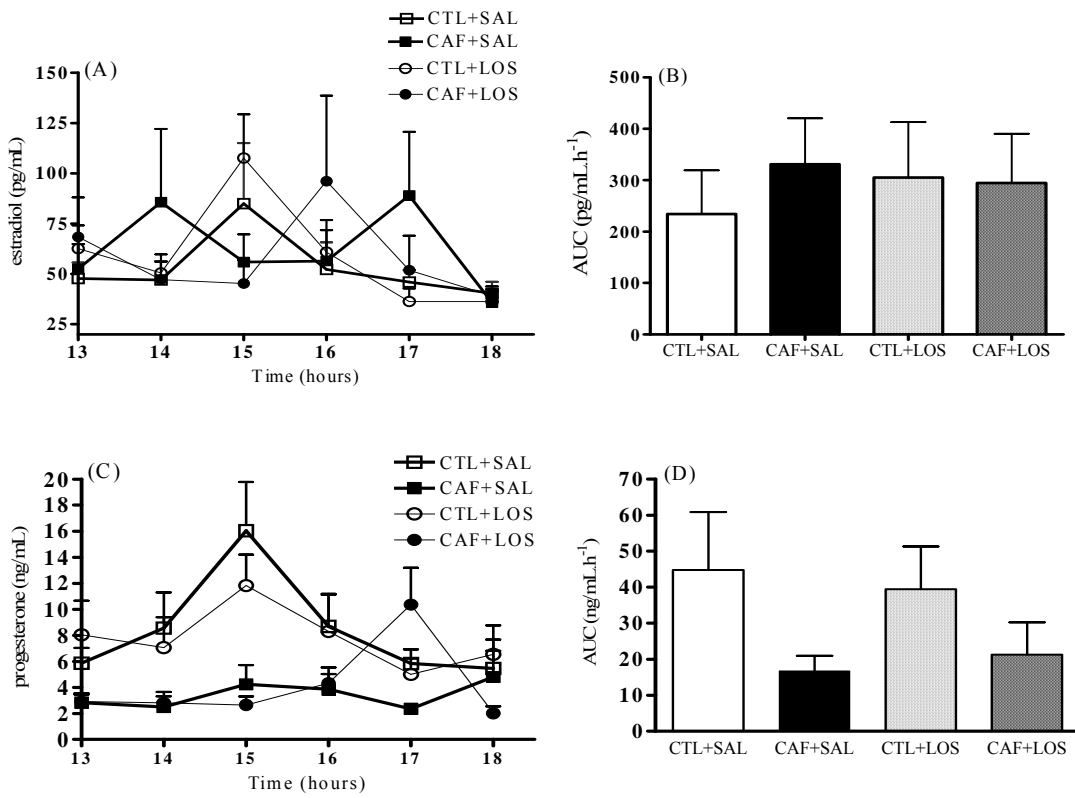


Figure 7

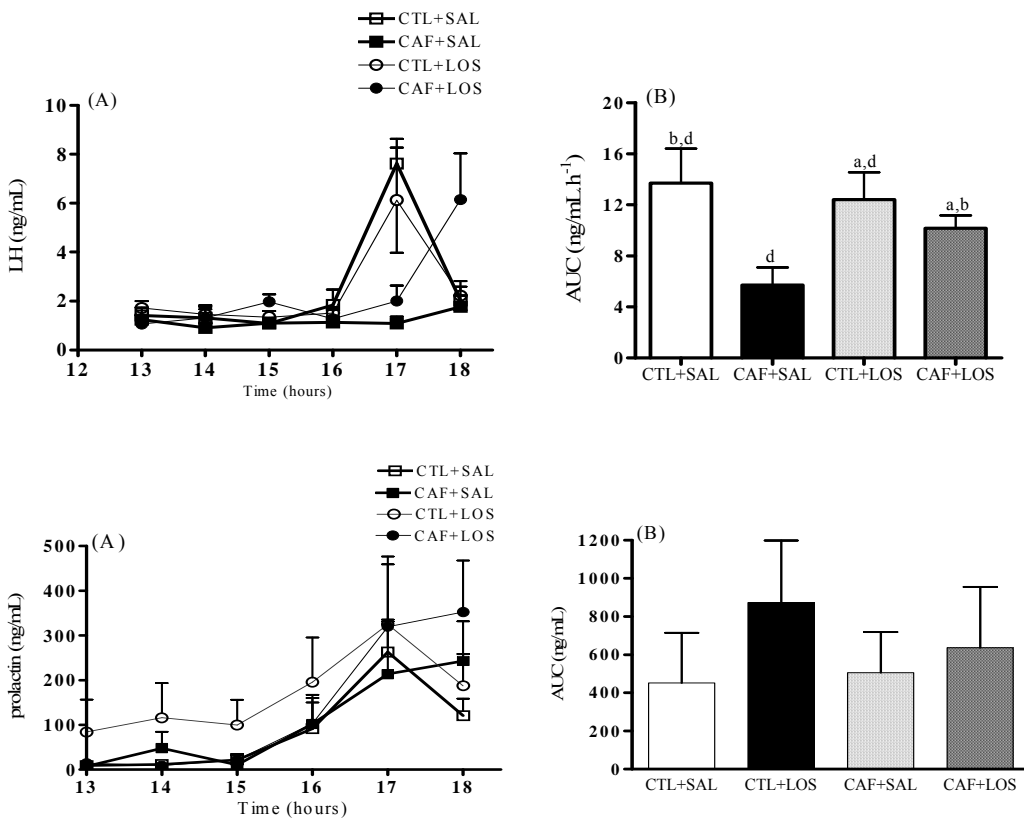


Table 1

	CTL + SAL	CAF + SAL	CTL + LOS	CAF + LOS
Body weight (g)	242.7 ± 3.79*	263.69 ± 5.33*	229.65 ± 2,88*	244.03 ± 2.24*
Perigonadal fat (g/100g body weight)	3.46 ± 0.17*	8.37 ± 0.12*	2.79 ± 0,23*	3.16 ± 0,19*
Retroperitoneal fat (g/100g body weight)	0.54 ± 0.03*	2.11 ± 0.16*	0.68 ± 0.02*	0.62 ± 0.04*
TG (mg/dL)	81.00 ± 3.58*	107.00 ± 8.67	77.17 ± 5.61*	79.60 ± 7.03*
Total cholesterol (mg/dL)	63.07 ± 6.72	73.84 ± 4.70	79.47 ± 5 .36	62.48 ± 5.81
HDL (mg/dL)	30.29 ± 0.89*	29.80 ± 3.02	32.43 ± 1.70*	31.67 ± 2.26*
LDL (mg/dL)	38.73 ± 5.86*	60.04 ± 6.11	44.86 ± 3.37*	32.08 ± 4.15*

Data are means ± SEM (n = 8). **P* < 0,05 vs CAF + SAL.