UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

MESTRADO EM SAÚDE E NUTRIÇÃO

ÁREA: BIOQUÍMICA E FISIOPATOLOGIA DA NUTRIÇÃO

Marcela De Marchi Pereira

ANGIOTENSINA II E ANGIOTENSINA 1-7: AÇÃO ANORÉXICA CENTRAL EM RATOS PRIVADOS DE ALIMENTO

Ouro Preto

2014

Marcela De Marchi Pereira

ANGIOTENSINA II E ANGIOTENSINA 1-7: AÇÃO ANORÉXICA CENTRAL EM RATOS PRIVADOS DE ALIMENTO

Defesa de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre. .

Orientadora: Profª. Drª. Andreia Carvalho Alzamora

Coorientadora: Profª Drª. Lisandra Brandino de Oliveira

Ouro Preto

2014

P436a Pereira, Marcela De Marchi.
Angiotensina II e Angiotensina 1-7 [manuscrito]: Ação anoréxica central em ratos privados de alimento / Marcela De Marchi Pereira. - 2014.
70f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Profa. Dra. Andreia Carvalho Alzamora.
Coorientador: Profa. Dra. Lisandra Brandino de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Nutrição. Departamento de Nutrição . Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição .
Área de Concentração: Saúde e Nutrição.

1. Angiotensina. 2. Cerebro - Ventriculos. 3. Anorexia. 4. Inanição. I. Alzamora, Andreia Carvalho. II. Oliveira, Lisandra Brandino de. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Titulo.

CDU: 613.2

Catalogação: www.sisbin.ufop.br

Mestrado
Saúde e Nutrição
UFOP
Universidade Federal de Ouro Preto

ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos dezoito dias do mês de junho de dois mil e catorze, às nove horas, no Auditório da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, realizou-se a defesa da dissertação de mestrado da aluna **Marcela De Marchi Pereira**. A banca examinadora, definida anteriormente, foi composta pelos Professores Daniela Caldeira Costa (UFOP), Leonardo Máximo Cardoso (UFOP), Andréia Carvalho Alzamora (UFOP) e Lisandra Brandino de Oliveira (UFOP). Dando início ao exame, a aluna apresentou sua dissertação de mestrado intitulada: "ANGIOTENSINA II E ANGIOTENSINA 1-7: AÇÃO ANORÉXICA CENTRAL EM RATOS PRIVADOS DE ALIMENTOS". Após a apresentação, a candidata foi arguida pela banca que avaliou o domínio do conteúdo metodológico e teórico relacionado à dissertação. Após julgamento, os membros da banca decidiram por:

[X] APROVAR [ ] REPROVAR

Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa (UFOP),
Examinadora Interna.

Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso (UFOP),
Examinador Externo.

Profa. Dra. Andréia Carvalho Alzamora (UFOP),
Orientadora.

Profa. Dra. Lisandra Brandino de Oliveira (UFOP),
Coorientadora.

Marcela De Marchi Pereira (UFOP),
Mestranda.

AGRADECIMENTOS:

Aos meus amados pais:

Adriana Paula e Dilson Luiz, por todo carinho, força e dedicação. *Amo muito vocês!*

Às minhas queridas irmãs:

Polyana De Marchi Pereira

Camilla De Marchi Pereira

Às minhas orientadoras pela oportunidade e confiança:

Prof. Dra. Andreia Carvalho Alzamora

Prof Dra. Lisandra Brandino de Oliveira

Aos meus amigos por todos os momentos compartilhados:

Marco Túlio, Carla, Thalisson, Bruna e Gabriela

Ao Laboratório de Hipertensão pelo apoio.

À FAPEMIG, CNPq e Escola de Nutrição, pela oportunidade de um mestrado com qualidade.

"Tudo posso Naquele que me fortalece".

RESUMO:

Os mecanismos angiotensinérgicos tem um importante papel na manutenção da homeostase, participando da regulação de vários sistemas como o sistema cardiovascular, renal, comportamentos ingestivos, dentre outros. Dentre as angiotensinas, duas merecem um destaque, a angiotensina II (ANG II) e angiotensina 1-7 (ANG 1-7) que podem exercer funções similares ou contrárias. Em relação à ingestão alimentar, estudos mostraram que a ANG II pode levar a uma redução do apetite, interferindo na atividade de mecanismos neurais envolvidos no controle central da fome/saciedade, sendo que estes estudos foram feitos principalmente em situações de ingestão basal (ingestão diária), não estimulada (privação de alimento) Todavia não se sabe se a ANG 1-7 também poderia ter algum papel no controle da ingestão alimentar. Portanto, neste trabalho foram investigados os efeitos centrais da ANG II e ANG 1-7 na ingestão de alimento induzida por privação de 24 h. Os ratos (280-320g) foram anestesiados e submetidos a uma cirurgia encefálica para implante de cânula no ventrículo lateral (VL). 5 dias após a cirurgia encefálica, os animais foram privados de alimento, com água *ad libitum*, por 24 horas. Após este tempo, foram iniciados os protocolos experimentais. 15 min antes de completar as 24h, houve injeção de 1 μL no VL de veículo (controle) ou da ANG II (100, 200 ou 400 ng/μL) ou ANG 1-7 ng/μL (100, 200 ou 400 ng/μL) ou dos antagonistas: Losartana (100 nmoL/μL), PD123319 (30 nmol/μL) e A779 (3 nmoL/μL). Sendo assim, foram realizados três protocolos diferentes (um para o estudo dos efeitos centrais da ANG II, outro para ANG 1-7 e outro para os antagonistas), cada um com quatro grupos. Em cada grupo houve administrações alternadas das diferentes concentrações de ANG II ou ANG 1-7 ou dos antagonistas e veículo (NaCl 0,9%), com intervalo de 48h entre cada experimento. Todos os experimentos foram realizados no período da tarde. ANOVA (de duas vias com ou sem medidas repetidas) e pós-teste Student Newman Keuls foram utilizados para analisar os resultados ($p<0,05$), sendo expresso em média ± erro padrão da média. Os resultados mostraram que ANG II 400 ng/μL injetada no VL, reduziu a ingestão de alimento quando comparada ao grupo controle (4,54 ± 0,77 vs veículo: 8,08 ± 0,66 g/120 min).

Em relação à ingestão de água, tanto ANG II 200 quanto a de 400 ng/μL aumentaram a ingestão de água (ANG II 200: 14,44 ± 2,5; ANG II 400: 17,42 ± 3,49 vs. veículo: 7,12 ± 1,18 ml/120 min). ANG 1-7 na concentração de 400 ng/μL injetada icv reduziu a ingestão de alimento induzida por privação (3,68 ± 0,49 vs veículo: 7,2 ± 0,66 g/120 min) e de água (4,88 ± 1,09 vs veículo: 11,0 ± 1,01 mL/120 min). Comparando o efeito da ANG II com a ANG 1-7, ambas na concentração de 400 ng/1 μL, observou-se que não houve diferença no efeito hipofágico entre estes peptídeos, porém enquanto a ANG II aumentou a ingestão de água, o tratamento com ANG 1-7 não foi diferente do controle. Enquanto losartana (100 nmoL/μL, antagonista de receptor AT1 da ANG II) reduziu, PD 123319 (30 nmoL/μL, antagonista de receptor AT2 da ANG II) ou A779 (3 nmoL/μL, antagonista de receptor MAS da ANG 1-7) não afetaram a ingestão de alimento induzida por privação (losartana: 6,0 ± 0,22; PD 123319: 7,8 ± 0,96 ; A779: 10,3 ± 0,42 vs veículo: 8,65 ± 0,82 g/120 min). Em relação à ingestão de água, losartana e PD 123319 reduziram, e A779 não alterou, a ingestão de água (losartana: 3,37 ± 1,56; PD 123319: 3,80 ± 1,90; A779: 13,62 ± 1,30 vs veículo: 9,67 ± 1,78 mL/120 min). Os resultados sugerem um efeito hipofágico central da ANG II e ANG 1-7 em ratos privados de alimento.

ABSTRACT:

The angiotensinergic mechanisms are related to an important role in the regulation of the hydroelectrolyte balance as in the cardiovascular system. Several studies have been published, showing the interaction of the angiotensinergic peptides (angiotensin – ANG II and ANG 1-7) in the modulation of blood pressure, evidencing counter regulatory mechanisms between ANG II and ANG 1-7 in the cardiovascular system control. It's already known that ANG II has an important role in the induction of hunger, interfering on the activity of some neurohormonal mechanisms involved on central hunger/satiation coordination. It's not understood, however, if the ANG 1-7 could also have some function on this hunger control. Therefore, was investigated on this paper the central effects of ANG II and ANG 1-7 in the intake of food, induced by a 24 hours of deprivation, as well as an interaction of this angiotensinergic central mechanisms on the control of hunger. Five days after the surgeries in the lateral ventricle (LV), the animals have been submitted to a food deprivation but with water *al libitum*, for 24 hours. After this period, experimental protocols were stared: 15 minutes before the 24 hours time complete, there was an injection of 1μ L inside LV of the agonists ANG II (100, 200 or 400 ng/μL), ANG 1-7 ng/μL (100, 200 or 400 ng/μL), or antagonists: Losartan (100nmoL/μL), PD123319 (30 nmol/μL) and A779 (3 nmoL/μL). Each protocol was divided in four groups, with an interval of 48 hours between them. Thus, three different protocols were performed (ANG II, ANG 1-7 and antagonist), each one with four groups. All experiments have been realized in the afternoon. ANOVA and Student Newman Keuls post-test were used to perform the analysis ($p < 0,05$), have been expressed as mean ± standard mean error. ANG II 400 ng/μL injected in LV showed a decrease in food ingestion compared with control (ANG 400: 4,54 ± 0,77 vs control: 8,08 ± 0,66 g/120 min). Water intake was increased with ANG II in 200 and 400 ng/μL concentrations, compared with control groups (ANG II 200: 14,44 ± 2,5; ANG II 400: 17,42 ± 3,49 vs. control: 7,12 ± 1,18 ml/120 min.). ANG 1-7 in 400 ng/μL showed a reduction on food intake compared to control (ANG 1-7: 3,68 ± 0,49 vs control: 7,2 ± 0,66 g/120 min) and watrer (4,88 ± 1,09 vs. control: 11,0 ± 1,01

mL/120 min). Comparing treatments, ANG II 400 ng/μL and ANG 1-7 400 ng/μL in both there was less intake of food compared to control. Losartan showed a decrease in food intake compared to control (losartan: 6,0 ± 0,22 vs. control: 8,65 ± 0,82 g/120 min). Regarding water intake, Losartan and PD 123319, respectively, showed a reduction in the ingestion compared to control (losartan: 3,37 ± 1,56; PD 123319: 3,80 ± 1,90 vs. control: 9,67 ± 1,78 mL/120 min). As described above, the results suggests that Ang II and Ang 1-7 reduced food intake after 24 hours of meal deprivation in mices.

ÍNDICE ANALÍTICO:

1. INTRODUÇÃO ---------- 16

1.1 Angiotensina II (ANG II) e angiotensina 1-7 (ANG 1-7) – *Aspectos gerais* ---------- 19

1.2 Angiotensina II (ANG II) e angiotensina 1-7 (ANG 1-7) – *ingestão de alimentos* ---------- 22

2. HIPÓTESE ---------- 26

3. OBJETIVO ---------- 27

3.1 Objetivo específico ---------- 27

4. MATERIAIS ---------- 28

4.1. Animais ---------- 28

4.2. Fármacos e soluções ---------- 28

4.2.1 Salina 0,9 % (Veículo) ---------- 28

4.2.2. Anestésico ---------- 28

4.2.3 Agonistas ---------- 29

4.2.4 Antagonistas ---------- 29

4.3. Injeções de drogas ---------- 29

5. MATERIAIS E MÉTODOS ---------- 29

5.1 Cirurgia encefálica (esteriotaxia) ---------- 29

5.2 Protocolo experimental ---------- 30

5.3 Análise estatística ---------- 34

6. RESULTADOS ---------- 35

6.1 Análise histológica ---------- 35

6.2 Injeção icv de ANG II ---------- 36

6.2.1 Ingestão cumulativa alimento e água após injeção icv de ANG II em ratos privados de alimento por 24 h. ---------- 36

6.2.2 Ingestão em cada período de medida da ingestão de alimento e água após injeção icv de ANG II em ratos privados de alimento por 24 h. ---------- 38

6.3 Injeção icv de ANG 1-7 ---------- 40

6.3.1 Ingestão cumulativa alimento e água após injeção icv de ANG 1-7 em ratos privados de alimento por 24 h. ---------- 40

6.3.2 Ingestão em cada período de medida da ingestão de alimento e água após injeção icv de ANG 1-7 em ratos privados de alimento por 24 h. ---------- 42

6.4 Comparação entre a injeção icv de ANG II e ANG 1-7 ------ 44

6.4.1 Comparação entre os efeitos centrais da ANG II e ANG 1-7 na ingestão de ração e água em ratos privados de alimento por 24 h.-- 44

6.4.2 Ingestão em cada período de medida da ingestão de alimento e água em cada período de medida após injeção icv de ANG II e ANG 1-7, em ratos 24 h privados de alimento. ---------- 46

6.5 Injeção icv de Losartana, PD 123319 e A779 ---------- 48

6.5.1. Ingestão cumulativa de alimento e água após injeção icv de Losartana, PD 123319 e A779, em ratos 24 h privados de alimento. --- 48

6.5.2 Ingestão em cada período de medida da ingestão de alimento e água após injeção icv de Losartana, Pd 123319 e A779, em ratos 24 h privados de alimento. ---------- 50

7. DISCUSSÃO ---------- 52

8. CONCLUSÃO ---------- 57

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ---------- 58

10. ANEXOS ---------- 70

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1: População de neurônios de neuropeptídios orexígenos (NPY/AGRP) e anorexígenos (POMC/CART) no núcleo arqueado, adjacente ao terceiro ventrículo, estão envolvidos na regulação da ingestão alimentar e homeostase energética no hipotálamo. Esses neurônios são regulados pela leptina no núcleo arqueado e projetam sinais para o Núcleo paraventricular, área hipotalâmica lateral e área perifornical. NPY: neuropeptídeo Y; AgRP: Peptídeo relativo a agouti; POMC: Pro-opiomelanocortinas; CART: transcriptor regulador de cocaína-anfetamina; Leptin: leptina; ARC: núcleo arqueado; PVN: núcleo paraventricular; LHA: área hipotalâmica lateral; PFA: área perifornical; Third ventricle: terceiro ventrículo (Schwartz e cols., 2000). ---------- 17

Figura 2: Mecanismo simplificado de formação de ANG II, ANG 1-9 e ANG 1-7 no sistema renina-angiotensina.---------- 20

Figura 3: Desenho esquemático da hipótese do trabalho. 3ºV = terceiro ventrículo; VL = ventrículo lateral. ---------- 26

Figura 4: Aparelho esteriotaxico ---------- 30

Figura 5: Os ratos receberam um implante no VL e posteriormente foram separados em 3 grupos: agonistas: ANG II (100, 200 e 400 ng/μL) e ANG 1-7 (100, 200 e 400 ng/μL) e antagonistas: Losartana (100 nmoL/μL), PD

123319 (30 nmoL/μL) e A779 (3 nmoL/μL). A injeção do veículo (NaCl 0,9%) foi usado como controle em todos os três grupos experimentais. Os animais foram submetidos aos três tratamentos de cada grupo e veículo (NaCl 0,9%), havendo um intervalo de 48 h entre cada protocolo e a sequência de injeções icv foi aleatória até que, no final, todos os animais receberam todos os quatro tratamentos ---------- 32

Figura 6: Cinco dias após as cirurgias encefálicas no VL, os animais foram submetidos a uma privação de alimento, com água ad libitum, por 24 horas e deu-se início os protocolos experimentais ---------- 33

Figura 7: Após a divisão dos grupos, os ratos foram colocados em restrição de alimento, agua *ad libitum*, 24horas antes de iniciar os protocolos experimentais. 15 min antes de completar às 24 horas, foi injetada no VL veículo (1 μl) e ANG II (100, 200 e 400 ng/μL) ou ANG 1-7 (100, 200 e 400 ng/μL) ou os antagonistas: Losartana (100 nmoL/μL), PD 123319 (30 nmoL/μL) e A779 (3 nmoL/μL). 15 minutos após a administração do fármaco, alimento e água foram oferecidos aos animais e as medidas de ingestão foram feitas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 min. ---------- 34

Figura 8: Fotomicrografia de um corte histológico do cérebro de um animal, indicando (seta) o local de injeção no ventrículo lateral (VL). ----- 35

Figura 9: Ingestão cumulativa de alimento (g) e água (mL) após injeção icv de ANG II 100, 200 e 400 ng/μl ou salina (1μl) em ratos 24 h privados de

alimento. As medidas de ingestão foram feitas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 min. Os resultados foram expressos em média ± EPM; n= 5. ---------- 37

Figura 10: Ingestões de alimento (g) e água (mL) medidas nos intervalos de tempo após injeção icv de ANG II 100, 200 e 400 ng/μl ou salina (1 μl) em ratos 24 h privados de alimento. As medidas de ingestão foram feitas nos intervalos de 0-30, 30-60, 60-90 e 90-120 min. Os resultados foram expressos em média ± EPM; n= 5. ---------- 39

Figura 11: Ingestão cumulativa de alimento (g) e água (mL) após injeção icv de ANG 1-7 100, 200 e 400 ng/μl ou salina (1 μl) em ratos 24 h privados de alimento. As medidas de ingestão foram feitas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 min. Os resultados foram expressos em média ± EPM; n= 5. ---------- 41

Figura 12: Ingestões de alimento (g) e água (mL) medidas nos intervalos de tempo após injeção icv de ANG 1-7 100, 200 e 400 ng/μl ou salina (1 μl) em ratos 24 h privados de alimento. As medidas de ingestão foram feitas nos intervalos de 0-30, 30-60, 60-90 e 90-120 min. Os resultados foram expressos em média ± EPM; n= 5. ---------- 43

Figura 13: Ingestão cumulativa de alimento (g) e água (mL) após injeção icv de ANG II e ANG 1-7 400 ng/μl ou salina (1 μl) em ratos 24 h privados de alimento. As medidas de ingestão foram feitas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 min. Os resultados foram expressos em média ± EPM; Salina n= 10, ANG II e ANG 1-7 n=5. ---------- 45

Figura 14: Ingestões de alimento (g) e água (mL) medidas nos intervalos de tempo após injeção icv de ANG II e ANG 1-7 400 ng/μl ou salina (1 μl) em ratos 24 h privados de alimento. As medidas de ingestão foram feitas nos intervalos de 0-30, 30-60, 60-90 e 90-120 min. Os resultados foram expressos em média ± EPM; Salina n=10, ANG II e ANG 1-7 n=5. ---------- 49

Figura 15: Ingestão cumulativa de alimento (g) e água (mL) após injeção icv de Losartana (100 nmoL/μl), PD 123319 (30 nmoL/μl), A779 (3 nmoL/μl) ou salina (1 μl) em ratos 24 h privados de alimento. As medidas de ingestão foram feitas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 min. Os resultados foram expressos em média ± EPM; n= 4. ---------- 51

LISTA DE ABREVIATURAS:

AgRP → Peptídeo relativo a agouti

AGT → Angiotensinogênio

ANG I → Angiotensina 1

ANG II → Angiotensina II

ANG 1-7 → Angiotensina 1-7

ANG 1-9 → Angiotensina 1-9

AT1 → Receptor tipo 1

AT2 → Receptor tipo 2

CART → transcriptor regulador de cocaína-anfetamina

CDV → Complexo dorsal do vago

ECA → Enzima conversora de angiotensina I

ECA II → Enzima conversora de angiotensina II

icv → Intracerebroventricular

NPY→ neuropeptídeo Y

OCV → Órgãos circunventrículares

OMS → Organização Mundial da Saúde

POMC → Pro-opiomelanocortinas

PPAR → receptor ativado pelo proliferador de peroxissomo

SRA → Sistema renina-angiotensina

VL → Ventrículo lateral

3ºV → Terceiro ventrículo

4ºV → Quarto ventrículo

1. INTRODUÇÃO:

Distúrbios alimentares, envolvendo um excesso ou falta de apetite, são um problema na sociedade moderna, podendo ser decorrentes tanto de problemas psicológicos quanto falhas nos mecanismos fisiológicos que norteiam nosso estado de saciedade e fome. Assim sendo, é de grande valia o estudo dos mecanismos centrais envolvidos no controle do apetite.

As vias neurais envolvidas tanto no controle da alimentação quanto no gasto energético estão distribuídas tanto pelo prosencéfalo quanto pelas áreas posteriores. Estruturas límbicas relacionadas com a via de recompensa estariam relacionadas com o controle não homeostático da ingestão alimentar, enquanto a integração do comportamento ingestivo homeostático seria feito pelo hipotálamo. Sinais que indicam o estado energético periférico como os hormônios gastrointestinais, pancreático e as adipocinas, podem sinalizar diretamente para o hipotálamo ou indiretamente via as áreas posteriores e fibras vagais aferentes (Benarroch, 2010; Suzuki e cols, 2010; 2012; Young 2012; Rinaman, 2010; Lent, 2010).

Estudos anteriores mostram que o hipotálamo é conhecido como um importante centro que controla a ingestão de alimentos e peso corporal (Clemente e cols., 1998; Schwartz e cols., 2000; Yoshida e cols., 2012). O núcleo hipotalâmico ventromedial é conhecido como o centro da saciedade, enquanto que a área hipotalâmica lateral como o centro da fome (Bray e cols., 1990; Clemente e cols., 1998). O núcleo arqueado e o núcleo paraventricular, respondem a sinais periféricos e secretam muitos neuropeptídios orexígenos e anorexígenos, que estão envolvidos na regulação da alimentação e homeostase energética (Leibowitz e cols., 2004; Schwartz e cols., 2000) (**Figura 1).**

Estudos iniciais envolvendo lesões de estruturas hipotalâmicas mostraram que quando o hipotálamo lateral foi lesionado, os animais apresentaram inanição; enquanto que o hipotálamo ventromedial induzia hiperfagia, após lesão (Mayer e Thomas, 1967). Atualmente se sabe que outras estruturas hipotalâmicas também estão envolvidas no controle da ingestão de alimentos,

como o núcleo arqueado que possui duas populações de neurônios envolvidas na regulação da ingestão alimentar: a via orexígena, com neurônios que co-expressam o neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo relativo a agouti (AgRP); e a via anorexígena, na qual os neurônios co-expressam as pro-opiomelanocortinas (POMC) e o transcriptor regulador de cocaína-anfetamina (CART). Ambas as populações se projetam para o núcleo paraventricular do hipotálamo, bem como para os núcleos dorsomedial, lateral e ventromedial do hipotálamo (Broberger e cols, 1998; Suzuki e cols 2010; 2012; Guyton e Hall, 2006).

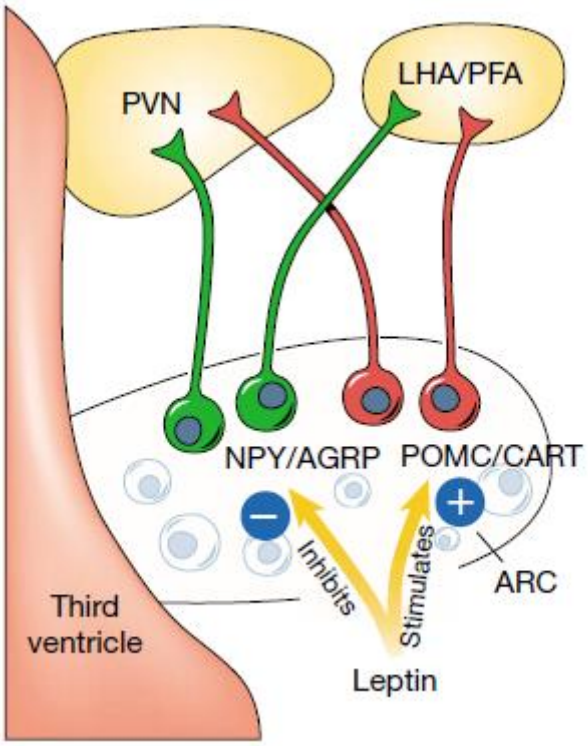

Figura 1: População de neurônios de neuropeptídios orexígenos (NPY/AGRP) e anorexígenos (POMC/CART) no núcleo arqueado, adjacente ao terceiro ventrículo, estão envolvidos na regulação da ingestão alimentar e homeostase energética no hipotálamo. Esses neurônios são regulados pela leptina no núcleo arqueado e projetam sinais para o Núcleo paraventricular, área hipotalâmica lateral e área perifornical. NPY: neuropeptídeo Y; AgRP: Peptídeo relativo a agouti; POMC: Pro-opiomelanocortinas; CART: transcriptor regulador de cocaína-anfetamina; Leptin: leptina; ARC: núcleo arqueado; PVN: núcleo

paraventricular; LHA: área hipotalâmica lateral; PFA: área perifornical; Third ventricle: terceiro ventrículo (Schwartz e cols., 2000).

As áreas posteriores, o complexo dorsal do vago (CDV) teria um papel importante na regulação homeostática da ingestão de alimentos uma vez que é uma importante via de ligação entre os sinais periféricos e o hipotálamo. O CDV se projeta tanto para o hipotálamo quanto para centros corticais superiores, assim como, o hipotálamo também envia projeções para as áreas posteriores. O CDV compreende o núcleo motor dorsal do vago, área postrema e o núcleo do trato solitário, o qual pode integrar sinais periféricos, devido sua proximidade com a área postrema que é um dos órgãos circunventriculares (estruturas que apresentam uma barreira hematoencéfalica incompleta os envolvendo, e, portanto mais acessíveis aos sinalizadores periféricos) (Bailey, 2008; Stanley e cols., 2005, Rinaman, 2003; Young e cols, 2012; Suzuki e cols, 2010 e 2012; Rinaman, 2010). Lesões da área postrema ou vagotomia atenuam os efeitos dos hormônios gastrointestinais no controle da ingestão alimentar (Abbott e cols, 2005; Koda e cols., 2005; Date e cols, 2002; van der Kooy, 1984; Schwartz e cols., 1978). Estes resultados sugerem um envolvimento das áreas posteriores no controle da ingestão de alimento.

É comum utilizar estratégicas farmacológicas com o objetivo de se determinar os mecanismos envolvidos numa resposta fisiológica. Administração nos ventrículos encefálicos (ventrículos laterais – VL; terceiro e quarto ventrículo – 3ºV e 4ºV) tem o objetivo de verificar se as áreas periventriculares poderiam ou não estarem envolvidas numa determinada resposta ou se um determinado mecanismo naquela região poderia ser importante para uma resposta fisiológica. Administração de fármacos nos VL e 3ºV poderiam atingir estruturas hipotalâmicas, assim como, administração no 4ºV poderia influenciar na atividade da área postrema e do núcleo do trato solitário. Injeção de leptina (hormônio produzido no tecido adiposo) no VL, 3ºV e 4ºV reduziu a ingestão de alimento por mais de 24 h (Grill e Kaplan, 2002). Injeção intracerebroventricular (icv) de CART inibiu a ingestão de alimento

(Kristensen e cols., 1998), enquanto que a injeção icv de NPY estimulou a ingestão de alimentos (Clark e cols., 1984). Outros estudos mostraram que a administração crônica do NPY, provocou uma hiperfagia, desenvolvendo obesidade, além de uma resistência a insulina (Stanley e cols., 1986; Raposinho e cols., 2001 e 2004). Baseando-se nestes dados, observa-se que as estruturas periventriculares estão envolvidas no controle da ingestão alimentar.

1.1 Angiotensina II (ANG II) e angiotensina 1-7 (ANG 1-7) – *Aspectos gerais*

Tanto a ANG II quanto a ANG 1-7 são formadas pelo sistema renina-angiotensina (SRA), e tem-se procurado compreender melhor este sistema, a fim de definir o papel dele nas condições fisiólogicas e patológicas.

Dentre as funções do SRA observa-se um papel na regulação da pressão arterial, do equilíbrio hidroeletrolítico, e estudos anteriores têm sugerido o envolvimento deste sistema na obesidade relacionada à hipertensão (Velkoska e cols., 2010).

A renina é uma enzima proteolítica sintetizada a partir da pró-renina, a qual é armazenada e liberada de imediato após estímulo. Na circulação, essa enzima cliva o angiotensinogênio (AGT), formando a angiotensina I (ANG I), que será clivada pela enzima conversora da angiotensina I (ECA) em ANG II. Além disso, a ANG I pode ser clivada através da enzima conversora de angiotensina II (ECA II) em angiotensina 1-9 (ANG 1-9) e pela endopeptidase em angiotensina 1-7 (ANG 1-7). A ANG 1-9 pode ser convertida em ANG 1-7 através da ECA I. Por sua vez, ANG II também pode ser convertida em ANG 1-7, através da ECA II. Esta desempenha um papel fundamental no equilíbrio dos mediadores do SRA, uma vez que pode converter ANG II, um vasoconstritor periférico, em ANG 1-7, um vasodilatador periférico. A ANG II se liga aos seus receptores específicos, receptores do tipo 1 (AT1) e receptores do tipo 2 (AT2), já a ANG 1-7 ao receptor MAS (MAS-R) (Vickers e cols., 2002;

Chappell e cols., 1998; Campbell e cols., 2004; Pinheiro e Silva, 2011) **(Figura 2).**

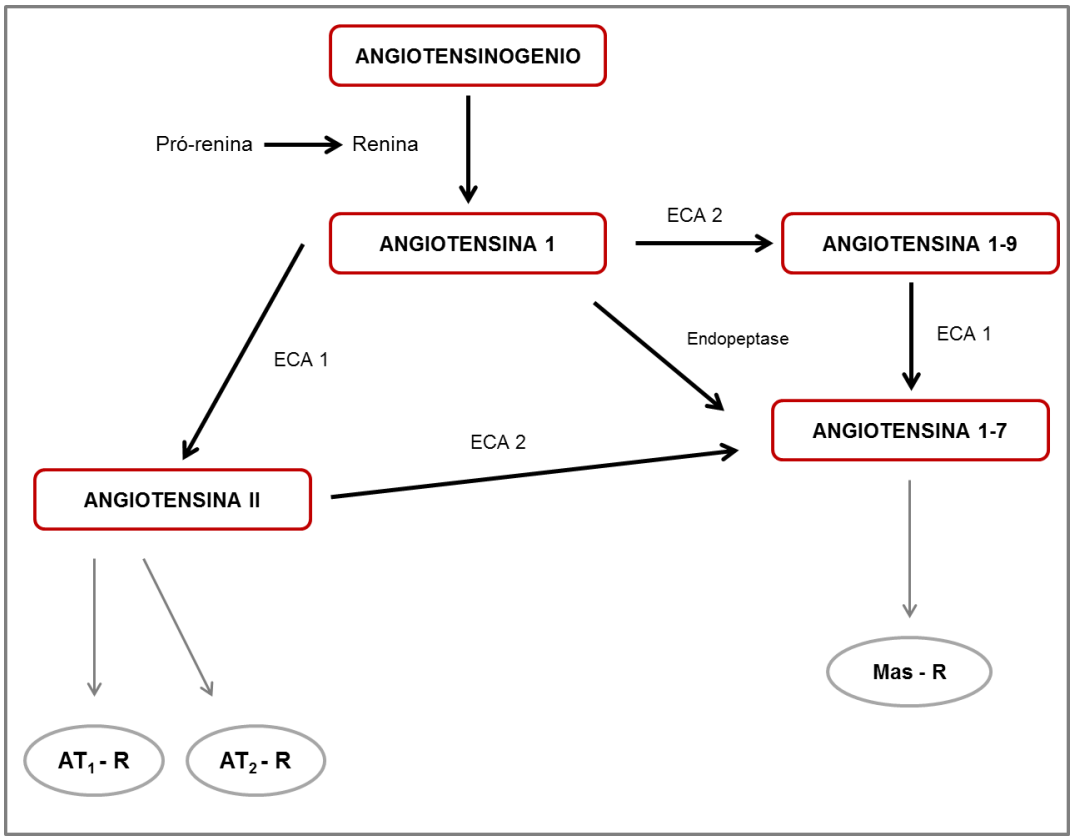

Figura 2: Mecanismo simplificado de formação de ANG II, ANG 1-9 e ANG 1-7 no sistema renina-angiotensina.

ANG II e ANG 1-7 apresentam uma série de ações fisiológicas mediadas pela ligação das mesmas aos seus respectivos receptores. Infusão central de A ANG II desencadeia um aumento imediato na ingestão de água, seguido de um apetite crônico por sódio (Fitzsimons, 1998; Formenti e Colombari, 2011), que é um comportamento motivacional elementar, assim como a ingestão de alimento. Também apresenta um importante papel na regulação da pressão arterial e no sistema renal, entre outros (Dzau, 1987; Johnston e cols, 1992). A ação central da ANG II formada perifericamente poderia ser decorrente da sua ação nos órgãos circunventriculares (OCV). Os OCVs mantém inúmeras conexões recíprocas com regiões do encéfalo que estão envolvidas na regulação da pressão arterial e na homeostase do fluido corporal (Hasser e

cols., 2000), e eles permitem que não apenas a ANG II, mas outros peptídeos produzidos perifericamente, possam exercer uma ação central.

Uma ampla gama de ações fisiológicas da ANG II ocorre por meio da sua interação com os receptores AT1 (Santos e cols., 2008a, Santos e cols, 2009). Tradicionalmente, a ANG II está envolvida em processos fisiológicos e fisiopatológicos relacionados ao sistema renal e cardiovascular. Além disso, esse peptídeo é capaz de provocar a degradação de proteína e atrofia do músculo esquelético (Brink e cols., 1996; Brink e cols., 2001; Yoshida e cols., 2012). Outros estudos mostram que a ANG II está implicada no controle da adiposidade por meio da síntese e armazenamento de lipídeos nos adipócitos, associando o SRA à síndrome metabólica (Leung e cols., 2006; Santos e cols., 2009). O SRA está estimulado no obeso, particularmente nos que apresentam obesidade visceral, em que se encontra uma grande atividade/concentração plasmática de renina, angiotensina e aldosterona (Suplicy, 2000). Esse sistema participa em processos patológicos de forma subjacente para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, assim como na síndrome metabólica (Yoshida e cols., 2012).

Coelho e cols. (2010) mostraram elevados níveis plasmáticos de ANG II em ratos alimentados com frutose e sacarose, o que poderia estar contribuindo para o desenvolvimento da síndrome metabólica. Além disso, o tecido adiposo expressa componentes importantes do SRA, sendo que a produção de AGT pelo tecido adiposo em roedores contribuiu para um terço dos níveis circulantes de AGT. O aumento dessa produção pode estar associado, em parte, às doenças metabólicas e inflamatórias relacionadas com a obesidade. Isso apoia a ideia de que além da via tradicional de formação de ANG II, ela também é produzida pelo tecido adiposo e pode refletir na regulação da massa gordurosa e distúrbios associados no controle da pressão arterial (Yvan e Quignard, 2011).

A ANG 1-7 é outro importante produto do SRA, sendo o principal derivado da ANG I, por uma via que é independente da ECA (Santos e cols., 2008 a,b). Estudos demonstraram que ANG 1-7 possui relevantes ações centrais no controle cardiovascular (Campagnole-Santos e cols., 1992; Fontes

e cols., 1994) e secreção de vasopressina (Schiavone e cols., 1988). Contrastando com ANG II, e sse peptídeo não estimula a sede e não tem um efeito pressor quando administrado perifericamente ou icv (Santos e cols., 1994**;** Silva e cols., 1988).

Um papel para ANG 1-7 no controle do balanço hidroeletrolítico foi sugerido pela observação que, além das suas ações de liberação de vasopressina *in vitro* (Schiavone e cols., 1988), a ANG 1-7 apresenta um potente efeito antidiurético em ratos (Santos e cols., 1992), influencia na reabsorção de fluidos e bicarbonato no túbulo contorcido proximal (Garcia e cols., 1994), e sua concentração no plasma é aumentada em ratos tratados cronicamente com sal (Botelho e cols., 1994).

A ANG 1-7 também apresenta um efeito cardioprotetor, por potencializar a vasodilatação por meio da liberação de bradicinina (Kucharewicz, 2002; Lima e cols., 1997; Li e cols., 1997). Tem sido demonstrado que a ANG 1-7 protege funções cardíacas e do endotélio, bem como a perfusão coronária no modelo de insuficiência cardíaca. Embora alguns efeitos da ANG II e ANG 1-7 possam ser contra reguladores, em algumas situações eles podem ser similares, como no caso de ambas estimularem a secreção de vasopressina, e em estudo de Ferreira e cols. (2001) observou-se que concentrações fisiológicas de ANG II e ANG 1-7 foram capazes de produzir um efeito antiarritmogênico em modelo de isquemia.

Da mesma forma que já foi detectado uma atuação da ANG II no tecido adiposo, o estudo de Coelho e cols (2010) mostrou pela primeira vez que os níveis de ANG 1-7 e ECA II também estavam aumentados no tecido adiposo, quando ratos foram tratados durante 30 dias com sacarose.

Portanto, nota-se que tanto ANG II quanto ANG 1-7 estariam envolvidas na regulação cardiovascular, no equilíbrio hidroeletrolítico e aparentemente, em mecanismos presentes na obesidade, sendo que a ANG II e ANG 1-7, podem apresentar efeitos semelhantes ou contrários.

1.2 Angiotensina II (ANG II) e angiotensina 1-7 (ANG 1-7) – *ingestão de alimentos*

Há alguns estudos que relatam um importante papel da ANG II na regulação do apetite. Infusão crônica icv de ANG II reduziu o ganho de peso do animal tanto jovem quanto adulto, em parte por reduzir a ingestão de alimento e em parte por aumentar o gasto energético (Porter e cols, 2003; Porter e Potratz, 2004). Além disso, injeção icv de ANG II exerceu um efeito inibitório na ingestão de alimento durante a fase escura do ciclo diurno do animal, sendo que o efeito hipofágico da ANG II foi totalmente abolido após o bloqueio dos receptores tipo II (AT2), e o bloqueio dos receptores AT1, reduziu o efeito da ANG II, apenas após 7 h de tratamento (Nakano-Tateno e cols., 2012). Estes resultados sugerem tanto a participação dos receptores AT2 (mais proeminente) quanto AT1 no efeito hipofágico da ANG II. Já Yamamoto e cols (2011) demonstraram que camundongos knockout para receptores AT1 (tipo 1a) apresentam um aumento na sua ingestão alimentar, sugerindo a presença de uma via dependente do receptor AT1a na inibição da fome. Yoshida e cols (2012) também demonstraram a importância dos receptores AT1 no efeito hipofágico da ANG II, sugerindo que a redução do apetite produzida pela ANG II, seria central, via receptores AT1 que mediariam a diminuição na expressão hipotalâmica de NPY e orexina. Estudo de Schwartz e cols. (2000) mostrou que esses efeitos são mediados pelos receptores AT1 de ANG II e podem ser de suma importância para explicar os sintomas anoréxicos na caquexia.

Administração de captopril, inibidor da enzima conversora de ANG, não afetou a ingestão de alimento (Voigt e cols, 2007), embora outro trabalho tenha mostrado a redução da ingestão alimentar após tratamento com captopril (Di Nicolantonio e Weisinger, 1988). Considerando tratamentos de longa duração com antagonista dos receptores AT1, foi observado que telmisartana e candesartana, mas não losartana, reduziram a ingestão diária de alimento (Benson e cols., 2004; Raasch e cols., 2006). Em ratos privados de alimento, injeção periférica de irbesartana reduziu a ingestão de alimento (Voigt e cols, 2007). Interessantemente, Auberta e cols (2010) sugerem que o efeito anorexígeno da telmisartana em camundongos seria independente dos receptores AT1a. Além disso, *in vitro*, a telmisartana poderia apresentar também uma atividade agonista do receptor γ ativado pelo proliferador de peroxissomo (PPAR), que é independente do receptor AT1 (Benson e cols,

2004). Portanto, seria possível, que o efeito anorexígeno observado por estes antagonistas de receptores AT1, não seja via AT1.

A maioria dos estudos para verificar o efeito da ANG II no controle da ingestão alimentar foram tratamentos crônicos, tentando observar a ingestão diária (Nakano-Tateno e cols, 2012; Yoshida e cols, 2012), mas não induzida de alimentos, portanto, um dos objetivos deste trabalho foi verificar os efeitos da ativação (ANG II) e inibição dos receptores AT1 (losartana) e AT2 (PD 123319) nas estruturas periventriculares do VL (áreas prosencefálicas), na ingestão de alimento, induzida por privação de alimento.

Em relação a ANG 1-7, pouco sabe sobre seu efeito no comportamento ingestivo. Diferentemente da ANG II, ela não é capaz de induzir nem a sede, nem o apetite ao sódio (Mahon e cols, 1995), e em relação ao controle do apetite/saciedade, até onde sabemos, não há nenhum trabalho relacionando a ANG 1-7 e a ingestão alimentar, porém sabe-se que ela apresenta alguns efeitos metabólicos. Infusão crônica de ANG 1-7 melhora o quadro hipertensivo e a resistência à insulina causada por uma dieta rica em frutose (Giani e cols., 2009). Além disso, camundongos com deficiência do receptor MAS apresentaram um aumento na massa adiposa e nos níveis plasmáticos de colesterol, triglicerídeos, insulina e leptina (Santos e cols., 2010). Resultados de Oh e cols (2012) sugerem um possível envolvimento da ANG 1-7, atuando em receptores MAS, na perda de peso induzida pelo tratamento com captopril. Estudo de Andrade e cols (2014) mostrou que ratos alimentados durante 60 dias com uma dieta rica em gordura e tratados com ANG 1-7 via oral, apresentaram diminuição no peso corporal e gordura visceral, porém sem alterações quando avaliado à eficiência alimentar (ingestão de alimento/peso corporal). Portanto, uma vez que a ANG 1-7, além de apresentar efeitos metabólicos, também poderia levar a uma redução de peso corporal, e sabendo que redução do peso corporal pode envolver redução de ingestão e/ou aumento do gasto energético, seria possível que a ANG 1-7, tivesse um papel no controle da ingestão alimentar.

Assim sendo, outro objetivo deste trabalho foi investigar os possíveis efeitos da ANG 1-7 (e o seu receptor – MAS) em áreas periventriculares do VL (áreas prosencefálicas) no controle da ingestão alimentar.

Portanto, considerando que: 1) os mecanismos angiotensinérgicos tem um importante papel na regulação ou modulação do funcionamento de vários sistemas do nosso organismo, tanto em situações fisiológicas quanto patológicas; 2) há poucos dados na literatura em relação à participação destes mecanismos no controle da ingestão alimentar; 3) os distúrbios alimentares se tornaram um importante foco de estudo; se faz necessário compreender melhor os mecanismos neurais complexos que norteiam o controle da ingestão alimentar. Assim sendo, este trabalho busca compreender melhor a participação dos mecanismos angiotensinérgicos (ANG II e ANG 1-7) na regulação do apetite.

2. HIPÓTESE:

Sabendo que as áreas prosencefálicas estão envolvidas no controle da ingestão alimentar, e que os mecanismos angiotensinérgicos têm um importante papel em regular ou modular diversos mecanismos centrais envolvendo respostas fisiológicas homeostáticas, a hipótese deste trabalho, é que numa situação de privação de alimento, a ANG II e ANG 1-7 poderiam participar das vias neurais que desencadeiam a fome **(Figura 3)**.

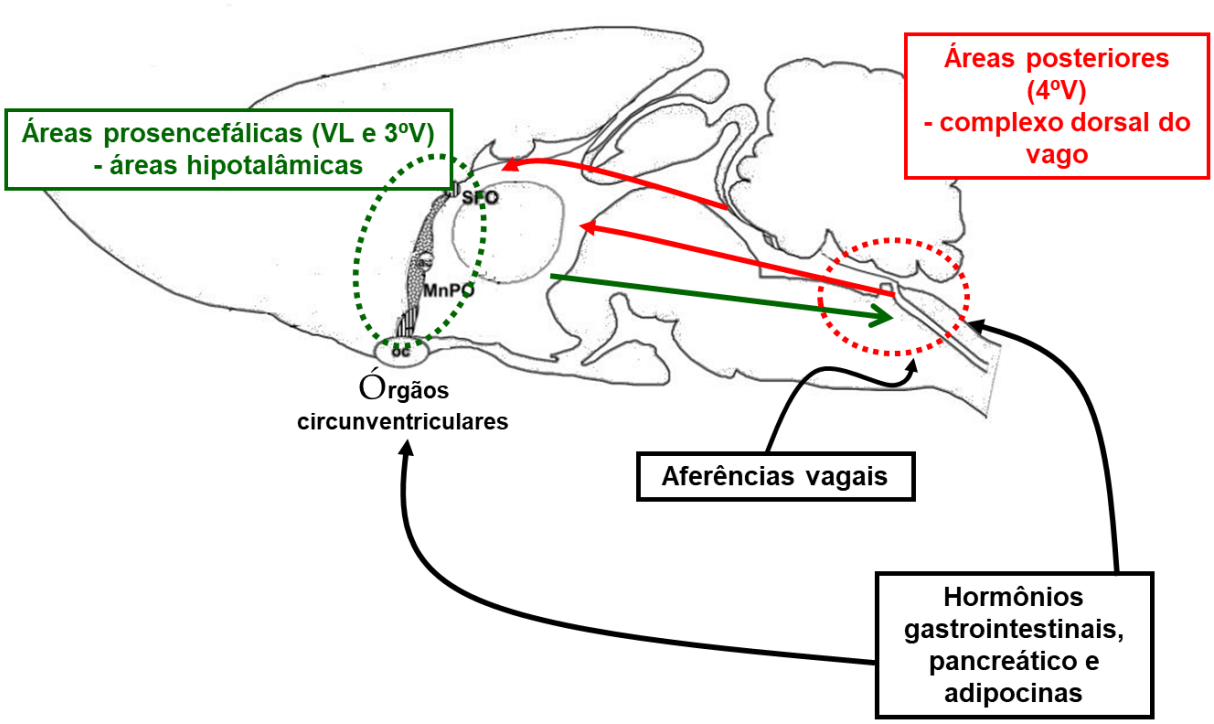

Figura 3: Desenho esquemático da hipótese do trabalho. 3ºV = terceiro ventrículo; VL = ventrículo lateral.

3. OBJETIVO:

O objetivo desse trabalho foi investigar os efeitos centrais da ANG II e ANG 1-7 na ingestão de alimento induzida por privação de alimento por 24 h.

3.1. Objetivo específico:

- Avaliar a ação da ANG II e ANG 1-7 e seus antagonistas no ventrículo lateral com o intuito de atingir as áreas periventriculares anteriores na ingestão de ração induzida por privação de alimento por 24h;

4. MATERIAIS

4.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar (280-320g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Ouro Preto. Os animais foram alojados em gaiolas coletivas (máximo 4 por gaiola), sob condições de temperatura (22 ± 3ºC) e humidade controlada (40-60%),ciclo claro-escuro 12h:12h (luzes acesas: 07:00h). Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram alojados em gaiolas individuais até o protocolo experimental. Os ratos receberam comida padrão e água ad libitum. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA UFOP - Protocolo: 2013/11)

4.2. Fármacos e soluções:

4.2.1 Salina 0,9% (veículo)

Esta solução foi preparada pela dissolução de 9,00 g de NaCl P.A. em q.s.p. 1000,00 mL de água destilada. A solução foi acondicionada em frasco de Mariotte e mantida em temperatura ambiente por um período máximo de 30 dias.

4.2.2 Anestésico

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados com os animais anestesiados (mistura de cetamina e xilasina). Para a obtenção da solução anestésica, pegou-se 2,5 mL de xilasina (concentração = 0,2 g/ mL) e verteu-a em 10 mL de cetamina (concentração = 0,1 g/ mL). Desta forma, chegou-se a concentração de 0,05 g de xilasina / mL de quetamina.

Cetamina (Syntec do Brasil Ltda)
Xilasina (Divisão Vetbrands Saúde Animal)

Ao preparar a mistura de anestésico, foi obtido uma proporção de 0,125mL/100g de rato

4.2.3 Agonistas:

Para avaliar a ação da ANG II e ANG 1-7, essas drogas foram utilizadas nas concentrações de 100, 200 e 400 ng/µl. Estudo de Nakano-Tateno e cols (2012) utilizou ANG II na concentração de 200 ng. Baseado neste trabalho, realizamos uma curva dose resposta para os dois agonistas.

4.2.4 Antagonistas:

Para avaliar a ação do antagonista dos receptores AT1 e AT2 da ANG II, foi utilizado losartana e PD 123319, respectivamente, e dos receptores MAS da ANG 1-7, o A-779. Determinou-se a concentração de losartana por meio da curva dose resposta: 50,100 e 150 nmol/µL (ANEXO 1). Já a concentração dos outros dois fármacos foi adaptada de estudos prévios PD 123319: 30 nmol/µL (Nakano-Tateno e cols, 2012) e A779: 3 nmol/µL (Silva e cols, 2014).

4.3. Injeções das drogas:

As drogas foram dissolvidas em salina e injetadas no ventrículo lateral (VL) dos ratos em volume de 1 µl. Para tanto, foi utilizada seringa Hamilton (10 µl) conectada por meio de um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora que foi introduzida na direção do VL via a cânula guia previamente fixada. A cânula injetora (0,3 mm diâmetro) foi 2 mm mais longa do que a cânula guia.

5. MÉTODOS GERAIS:

5.1. Cirurgia encefálica (esteriotaxia):

Para o implante de cânula encefálica, os ratos foram anestesiados com mistura de cetamina (80 mg/Kg de peso do rato) / Xilasina (7 mg/ Kg de peso do rato) posicionados a um aparelho estereotáxico **(Figura 4).** O lambda e bregma foram utilizados como referência para nivelar as cabeças dos ratos.

Pelo bregma foram determinados os pontos de introdução das cânulas de aço inoxidável na cabeça do animal, assim realizou-se uma trepanação do osso do crânio com uma broca esférica, abrindo um orifício de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro. Por fim, para atingir o ventrículo lateral (VL), cânulas de 10 x 0,5 mm d.i. foram orientadas de acordo com as seguintes coordenadas: 0,6 mm caudal ao bregma, 1,6 mm lateral à linha mediana e 3,8 mm abaixo da dura-máter. As cânulas foram fixadas ao crânio do rato com parafusos e resina acrílica.

Após a cirurgia encefálica, os ratos receberam uma injeção intramuscular (0,2 ml/rato) de antibiótico e anti-inflamatório (0,1 ml/rato) e permaneceram de recuperação em suas gaiolas por, pelo menos, 5 dias antes de iniciar os experimentos **(Figura 6)**.

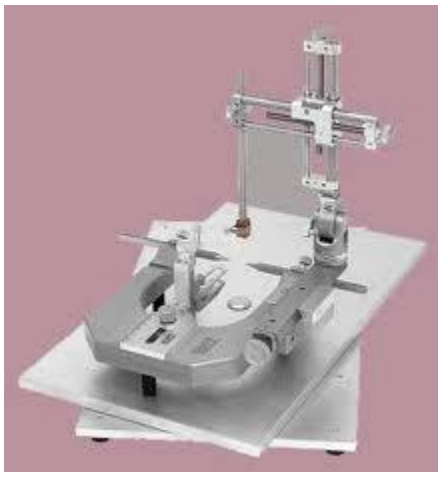

Figura 4: Aparelho esteriotaxico

5.2. Protocolos experimentais:

5 dias após as cirurgias encefálicas no VL, os animais foram submetidos a uma privação de alimento, com água *ad libitum*, por 24 horas **(Figura 5).** Após este tempo, foi iniciado os protocolos experimentais. 15min antes de completar 24h, houve injeção dos agonistas ANG II (100, 200 ou 400 ng/μL), ANG 1-7 ng/μL (100, 200 ou 400 ng/μL), ou antagonistas: Losartana (100nmoL/μL), PD123319 30 nmol/μL e A779 (3 nmoL/μL) **(Figura 6)**. Cada protocolo, foi dividido em quatro grupos, em que houve administrações

alternadas dos agonistas ou antagonistas e veículo (NaCl 0,9%), com intervalo de 48h entre eles. Sendo assim, foram realizados três protocolos diferentes (ANG II, ANG 1-7 e antagonistas), cada um com quatro grupos. Todos os experimentos foram realizados no período da tarde **(Figura 4)**.

A injeção foi realizada icv (VL) com administração de 1 μL por meio de uma seringa Hamilton, dos agonistas, antagonistas ou veículo. 15 minutos após a administração do fármaco, foram oferecidos ao animal alimento (previamente pesado) e bureta de vidro graduada contendo água. As medidas foram feitas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 min. Todos os animais foram submetidos aos três tratamentos de cada grupo e veículo (NaCl 0,9%), havendo um intervalo de 48 h entre cada protocolo e a sequência de injeções icv foi aleatória até que, no final, todos os animais receberam todos os quatro tratamentos (**Figura 7)**.

Ao final de cada grupo experimental, o rato foi anestesiado com mistura de cetamina+xilasina (0,125 mL/100g de ratos) e realizado perfusão cardíaca. Sendo assim, houve abertura do tórax para exposição do coração. No ventrículo cardíaco esquerdo, introduziu-se uma seringa (por onde foram injetadas as soluções de perfusão) e, concomitantemente, fez-se abertura do átrio direito, para o sangue e as soluções serem eliminadas por esta abertura. Após o bloqueio da artéria aorta abdominal, com uma pinça hemostática, procedeu-se à perfusão. Para a remoção do sangue e manutenção da integridade tecidual, injetou-se aproximadamente 40 ml de paraformoldeído a 4%. Após a retirada do encéfalo, o mesmo foi colocado em paraformoldeído a 4% até que encéfalos fossem cortados.

Em um último momento foram realizados os cortes histológicos, com 50 µm de espessura utilizando um microtomo criostato e montados em lâminas histológicas gelatinizadas. Após a montagem dos cortes, os mesmos foram analisados em microscópio ótico comum para visualização do ponto de injeção no VL.

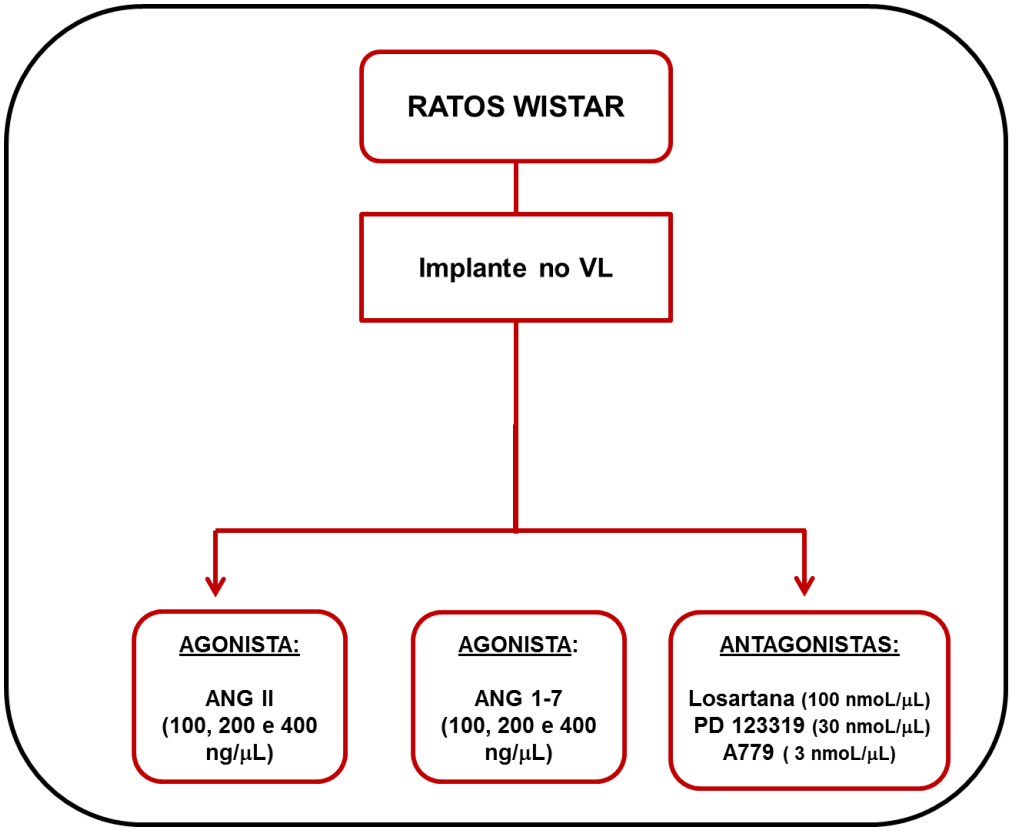

Figura 5: Os ratos receberam um implante no VL e posteriormente foram separados em 3 grupos: agonistas: ANG II (100, 200 e 400 ng/µL) e ANG 1-7 (100, 200 e 400 ng/µL) e antagonistas: Losartana (100 nmoL/µL), PD 123319 (30 nmoL/µL) e A779 (3 nmoL/µL). A injeção do veículo (NaCl 0,9%) foi usado como controle em todos os três grupos experimentais. Os animais foram submetidos aos três tratamentos de cada grupo e veículo (NaCl 0,9%), havendo um intervalo de 48 h entre cada protocolo e a sequência de injeções icv foi aleatória até que, no final, todos os animais receberam todos os quatro tratamentos.

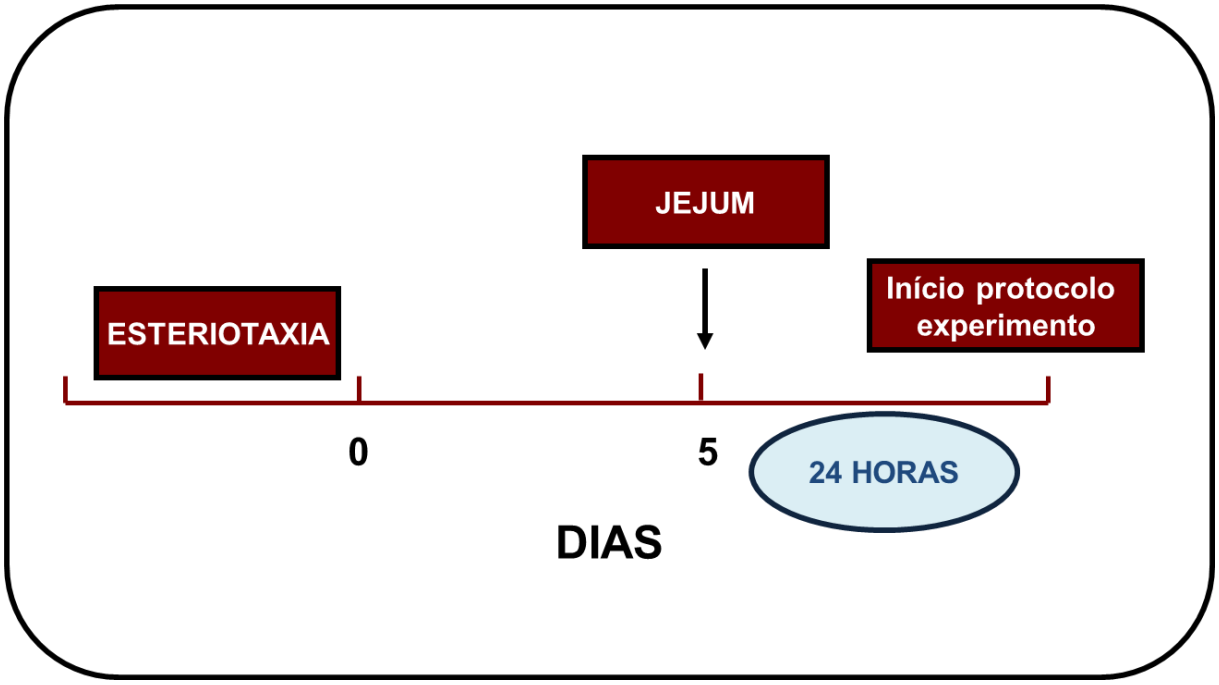

Figura 6: Cinco dias após as cirurgias encefálicas no VL, os animais foram submetidos a uma privação de alimento, com água ad libitum, por 24 horas e deu-se início os protocolos experimentais.

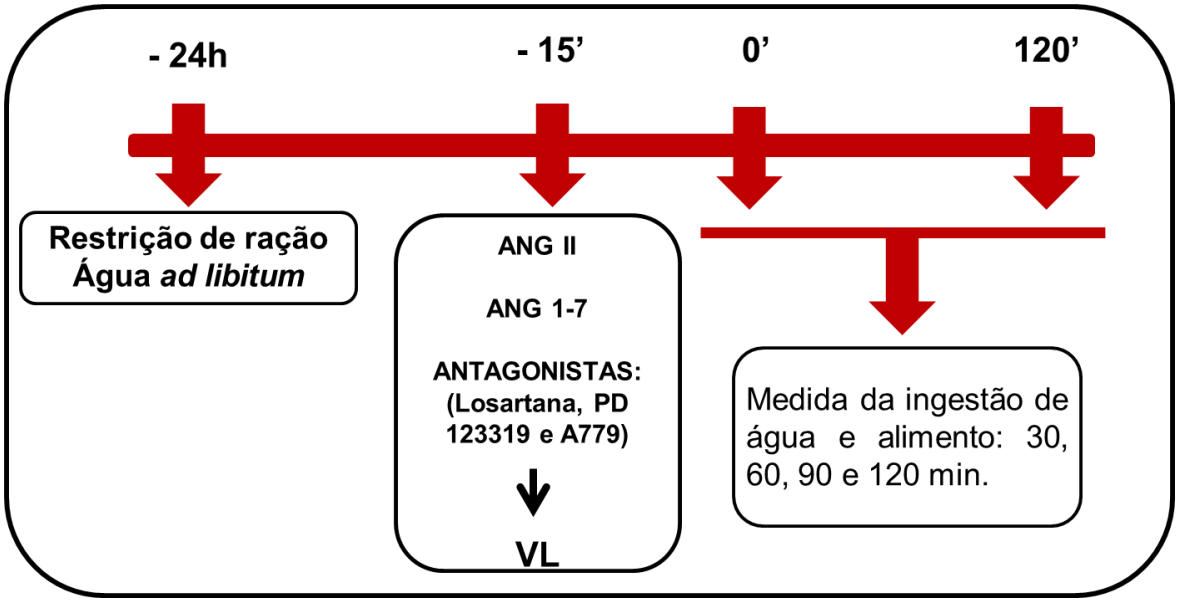

Figura 7: Após a divisão dos grupos, os ratos foram colocados em restrição de alimento, agua *ad libitum*, 24horas antes de iniciar os protocolos experimentais. 15 min antes de completar às 24 horas, foi injetada no VL veículo (1 μl) e ANG II (100, 200 e 400 ng/μL) ou ANG 1-7 (100, 200 e 400 ng/μL) ou os antagonistas: Losartana (100 nmoL/μL), PD 123319 (30 nmoL/μL) e A779 (3 nmoL/μL). 15 minutos após a administração do fármaco, alimento e água foram oferecidos aos animais e as medidas de ingestão foram feitas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 min.

5.3. Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados foi utilizada ANOVA de duas vias (para a comparação entre os efeitos da ANG II e ANG 1-7) ou ANOVA de duas vias com medidas repetidas (para todos os demais grupos), seguida do teste Student Newman Keuls. As variáveis analisadas foram tratamento e tempo. O software usado para a confecção dos gráficos foi o Sigma Plot 10.0 (Systat Software, Inc. Sigma Plot for Windows), e para as análises estatísticas foi o Sigma Stat 3.5 (Systat Software, Inc. Sigma Stat for Windows). O nível de significância foi fixado previamente em 5% ($p < 0,05$) e os resultados expressos como média acompanhada do respectivo erro padrão da média (M ± EPM).

6. RESULTADOS

6.1. Análise histológica

A figura 8 apresenta corte histológico mostrando o ponto de injeção no ventrículo lateral (VL).

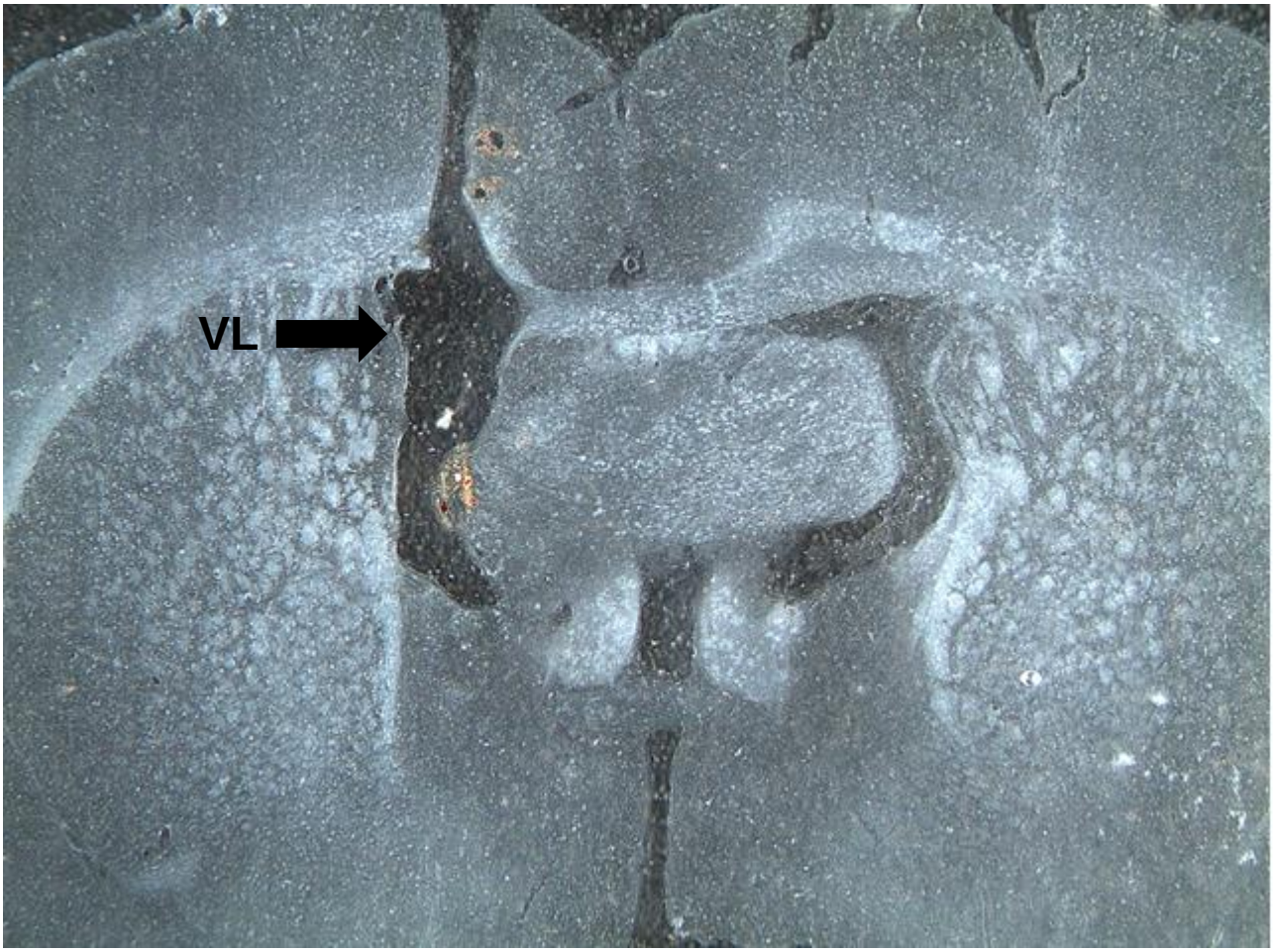

Figura 8: Fotomicrografia de um corte histológico do cérebro de um animal, indicando (seta) o local de injeção no ventrículo lateral (VL).

6.2. Injeção icv de ANG II:

6.2.1 Ingestão cumulativa de alimento e água após injeção icv de ANG II em ratos privados de alimento por 24 h.

ANG II 400 ng/μL injetada no VL, apresentou uma diminuição na ingestão de alimento comparado ao grupo controle e ANG II 100 e 200 ng/μL nos tempos de 90 e 120 minutos. Já em relação à ingestão de água, as concentrações de ANG II 200 e 400 ng/μL aumentaram a ingestão de água quando comparadas ao grupo controle nos tempos de 90 e 120 minutos. Porém, somente ANG II 400 ng/μL foi diferente do grupo controle nos primeiros 30 minutos **(Figura 9)**.

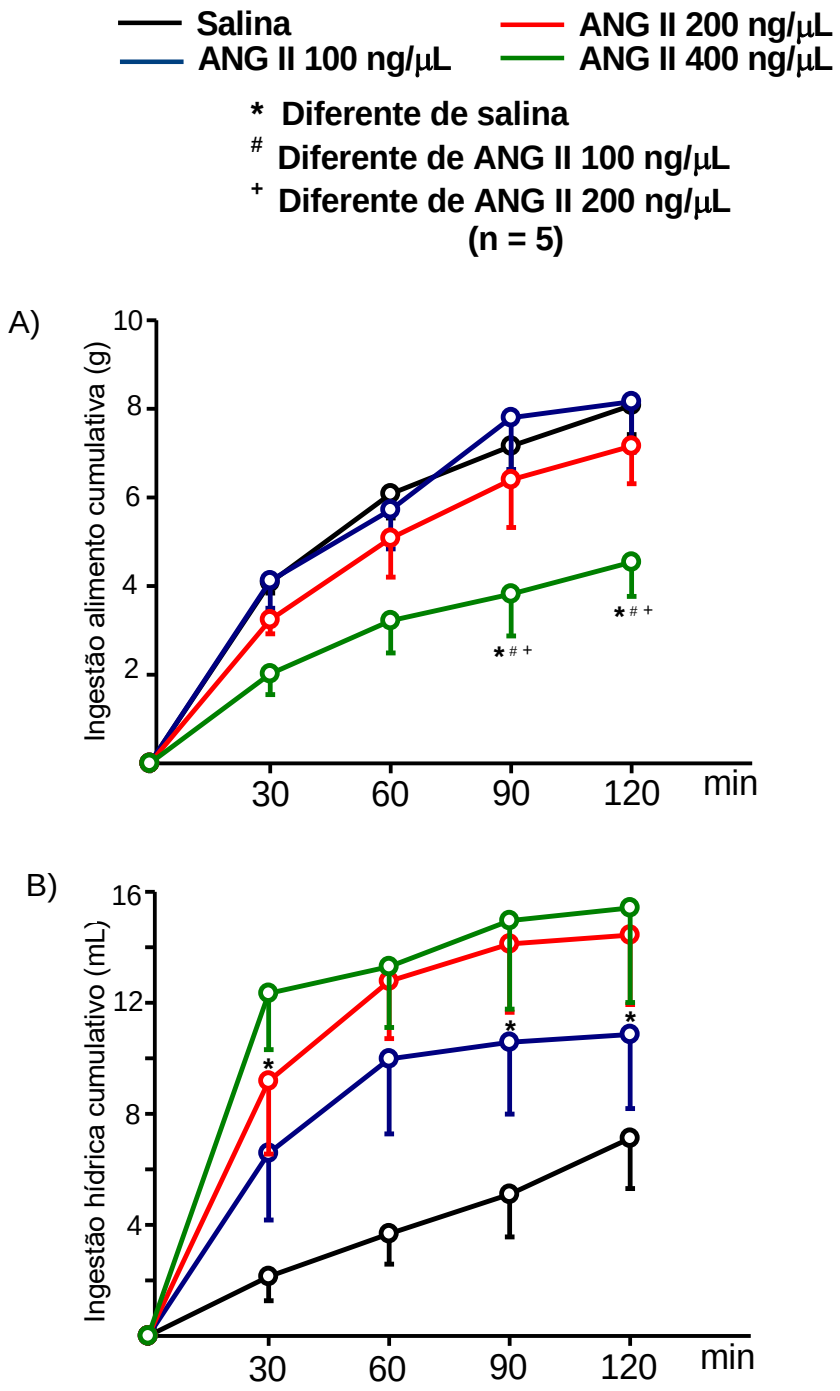

Figura 9: Ingestão cumulativa de alimento (g) e água (mL) após injeção icv de ANG II 100, 200 e 400 ng/µl ou salina (1µl) em ratos 24 h privados de alimento. As medidas de ingestão foram feitas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 min. Os resultados foram expressos em média ± EPM; n= 5.

6.2.2. Ingestão de alimento e água, medida nos intervalos de tempo, após injeção icv de ANG II em ratos privados de alimento por 24 h.

O tratamento com ANG II 400 ng/μL, injetada icv, apresentou uma diminuição na ingestão de alimento comparado ao grupo controle e ANG II 100 ng/μL para o primeiro período de medida (0-30 min). Ao analisar a ingestão de água, observa-se que todas as concentrações de ANG II (100, 200 e 400 ng/μL) aumentaram a ingestão de água no primeiro período de medida (0-30min) comparado ao grupo controle. **(Figura 10)**.

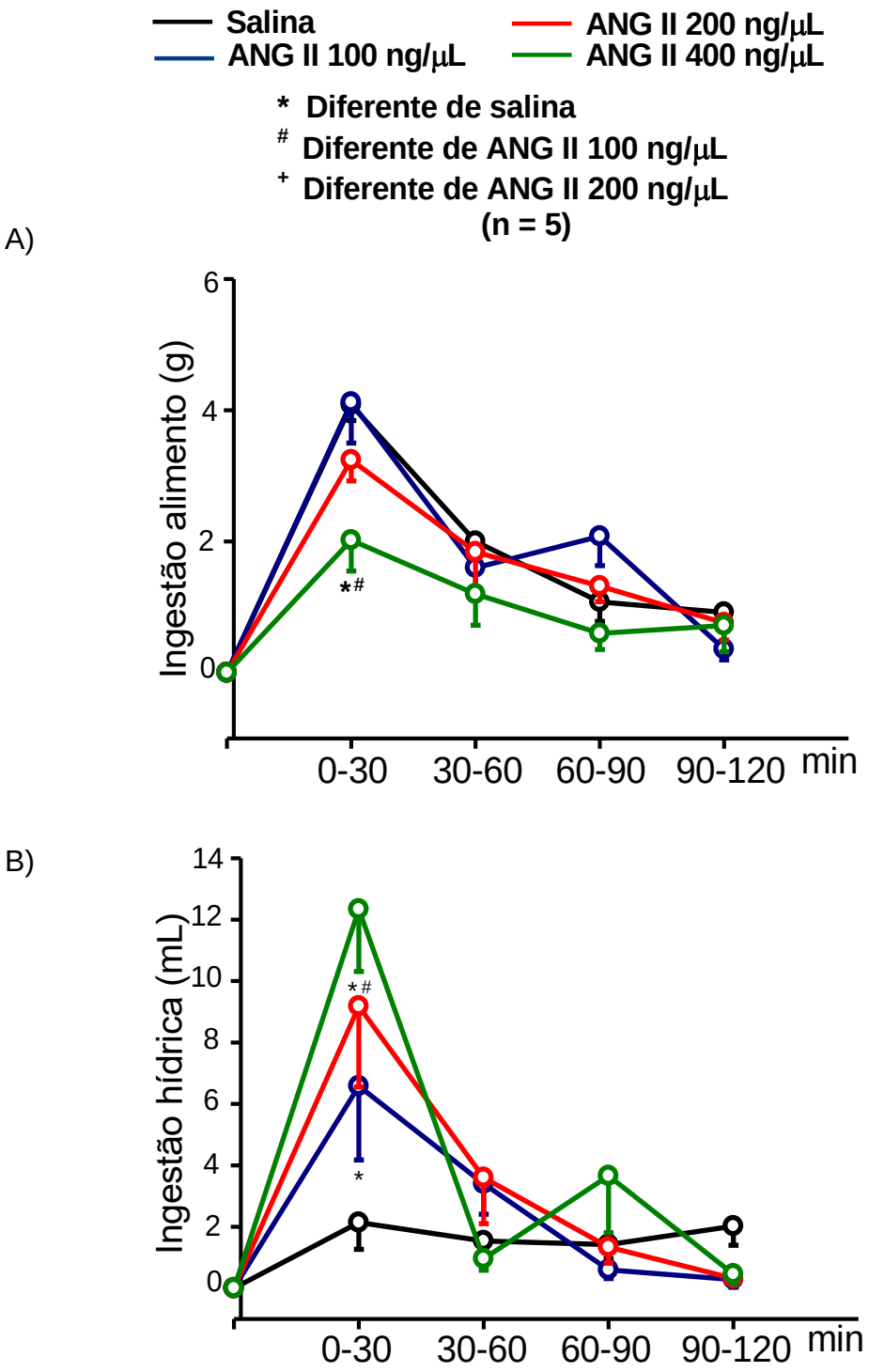

Figura 10: Ingestões de alimento (g) e água (mL) medidas nos intervalos de tempo após injeção icv de ANG II 100, 200 e 400 ng/µl ou salina (1 µl) em ratos 24 h privados de alimento. As medidas de ingestão foram feitas nos intervalos de 0-30, 30-60, 60-90 e 90-120 min. Os resultados foram expressos em média ± EPM; n= 5.

6.3 Injeção icv de ANG 1-7:

6.3.1. Ingestão cumulativa de alimento e água após injeção icv de ANG 1-7 em ratos privados de alimento por 24 h

ANG 1-7 400 ng/μL injetada no VL, apresentou uma diminuição na ingestão de alimento comparado ao grupo controle e ANG 1-7 100 ng/μL no tempo de 120 minutos. Quando analisada a ingestão hídrica, o tratamento ANG 1-7 400 ng/μL diminuiu a ingestão de água no tempo de 120 minutos em relação somente ao grupo controle **(Figura 11)**.

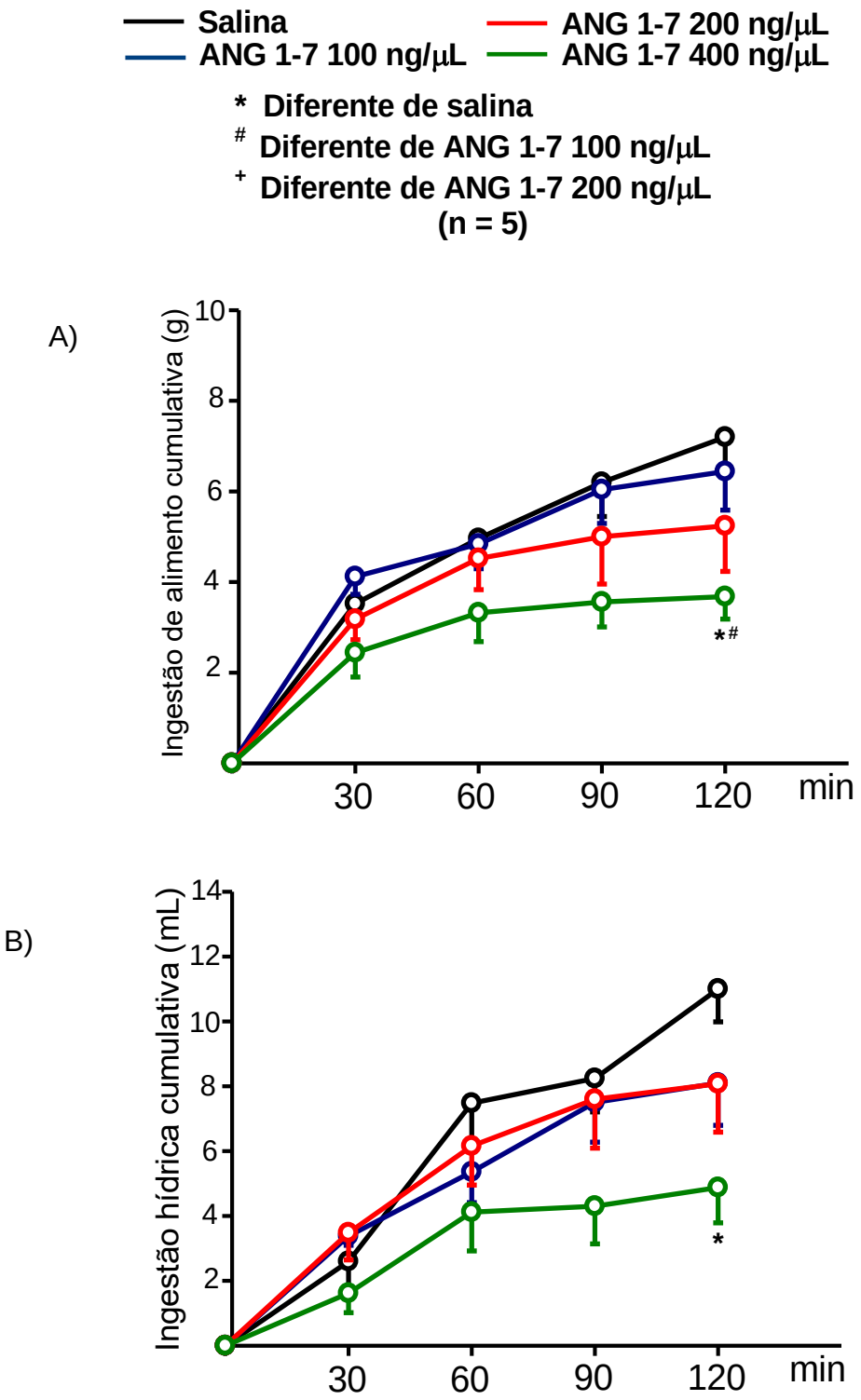

Figura 11: Ingestão cumulativa de alimento (g) e água (mL) após injeção icv de ANG 1-7 100, 200 e 400 ng/µl ou salina (1 µl) em ratos 24 h privados de alimento. As medidas de ingestão foram feitas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 min. Os resultados foram expressos em média ± EPM; n= 5.

6.3.2. Ingestão de alimento e água, medida nos intervalos de tempo, após injeção icv de ANG 1-7, em ratos 24 h privados de alimento.

O tratamento com ANG 1-7 400 ng/μL, injetada icv no VL, apresentou uma diminuição na ingestão de alimento comparado a ANG II 100 ng/μL no período de medição (0-30min). Ao analisar a ingestão de água, todos os tratamentos de ANG 1-7 (100, 200 e 400 ng/μL) foram diferentes do grupo controle no segundo período de medição (30-60 min), **(Figura 12)**.

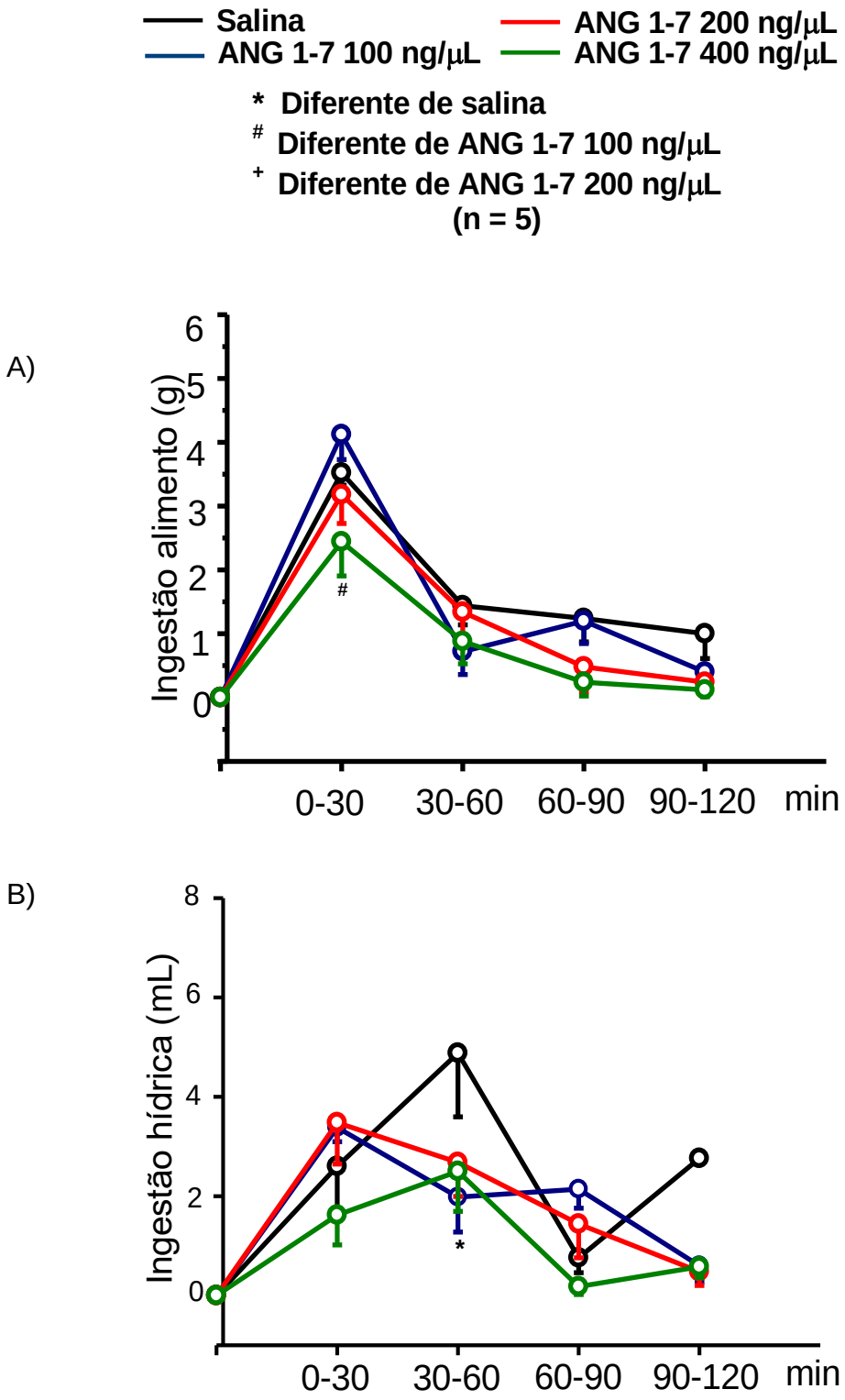

Figura 12: Ingestões de alimento (g) e água (mL) medidas nos intervalos de tempo após injeção icv de ANG 1-7 100, 200 e 400 ng/µl ou salina (1 µl) em ratos 24 h privados de alimento. As medidas de ingestão foram feitas nos intervalos de 0-30, 30-60, 60-90 e 90-120 min. Os resultados foram expressos em média ± EPM; n= 5.

6.4 Comparação entre os efeitos centrais da ANG II e ANG 1-7 em ratos privados de alimento

6.4.1 Comparação entre os efeitos centrais da ANG II e ANG 1-7 na ingestão de alimento e água em ratos privados de alimento por 24 h.

Ao fazer uma comparação dos tratamentos ANG II 400 ng/μL e ANG 1-7 400 ng/μL, observa-se que nos tempos de 60, 90 e 120 minutos, os dois grupos diminuíram a ingestão de alimento em relação ao grupo controle e não foram diferentes entre si. Ao analisar a ingestão hídrica, observa-se que somente a ANG II 400 ng/μL apresentou um aumento da ingestão hídrica, comparado ao grupo controle e ANG 1-7 400 ng/μL, para todos os tempos de medida (30, 60, 90 e 120 min), **(Figura 13)**.

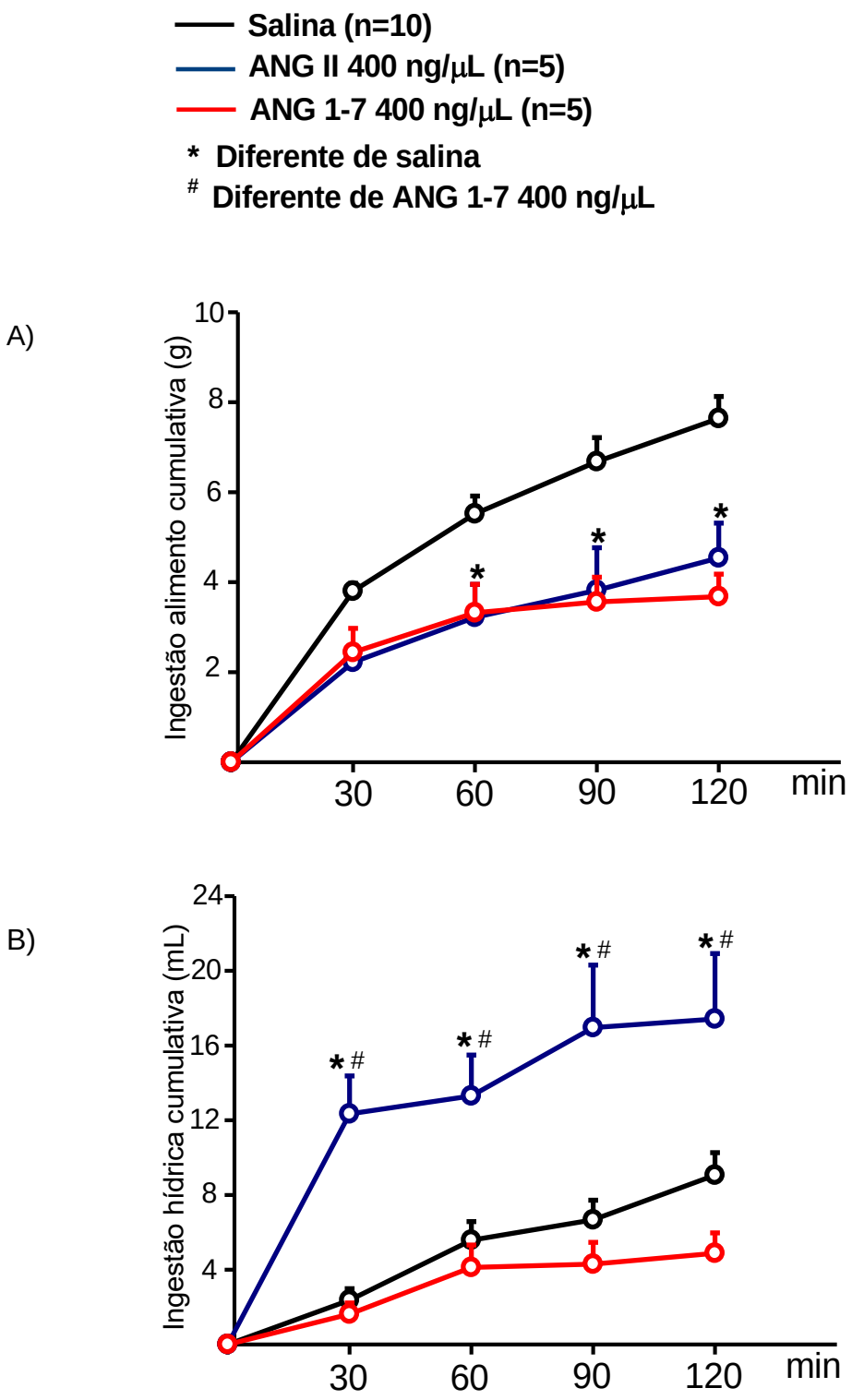

Figura 13: Ingestão cumulativa de alimento (g) e água (mL) após injeção icv de ANG II e ANG 1-7 400 ng/µl ou salina (1 µl) em ratos 24 h privados de alimento. As medidas de ingestão foram feitas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 min. Os resultados foram expressos em média ± EPM; Salina n= 10, ANG II e ANG 1-7 n=5.

6.4.2 Ingestão de alimento e água, medida nos intervalos de tempo, após injeção icv de ANG II e ANG 1-7, em ratos 24 h privados de alimento.

Ao fazer uma comparação dos tratamentos ANG II 400 ng/μL e ANG 1-7 400 ng/μL pelos períodos de medida, observa-se que nos dois tratamentos os animais ingeriram menos alimento somente no primeiro período de medida (0-30 min), comparado ao grupo controle. Já em relação à ingestão hídrica, os animais tratados com ANG II ingeriram mais água quando comparados ao grupo controle e ANG 1-7, também no primeiro período de medida (0-30min). Para ANG II 400 ng/μL, o rato bebeu água e comeu mais no primeiro período de medida (0-30 min). Já em relação a ANG 1-7 400 ng/μL, o rato não bebeu mais água em relação ao grupo controle, ou seja, ela não estimulou a sede, mas em relação ao alimento, assim como a ANG II 400 ng/μL, promoveu uma diminuição na ingestão de alimento. Esses dados sugerem que ANG II e ANG 1-7 (400 ng/μL) promoveram um efeito anoréxico **(Figura 14)**.

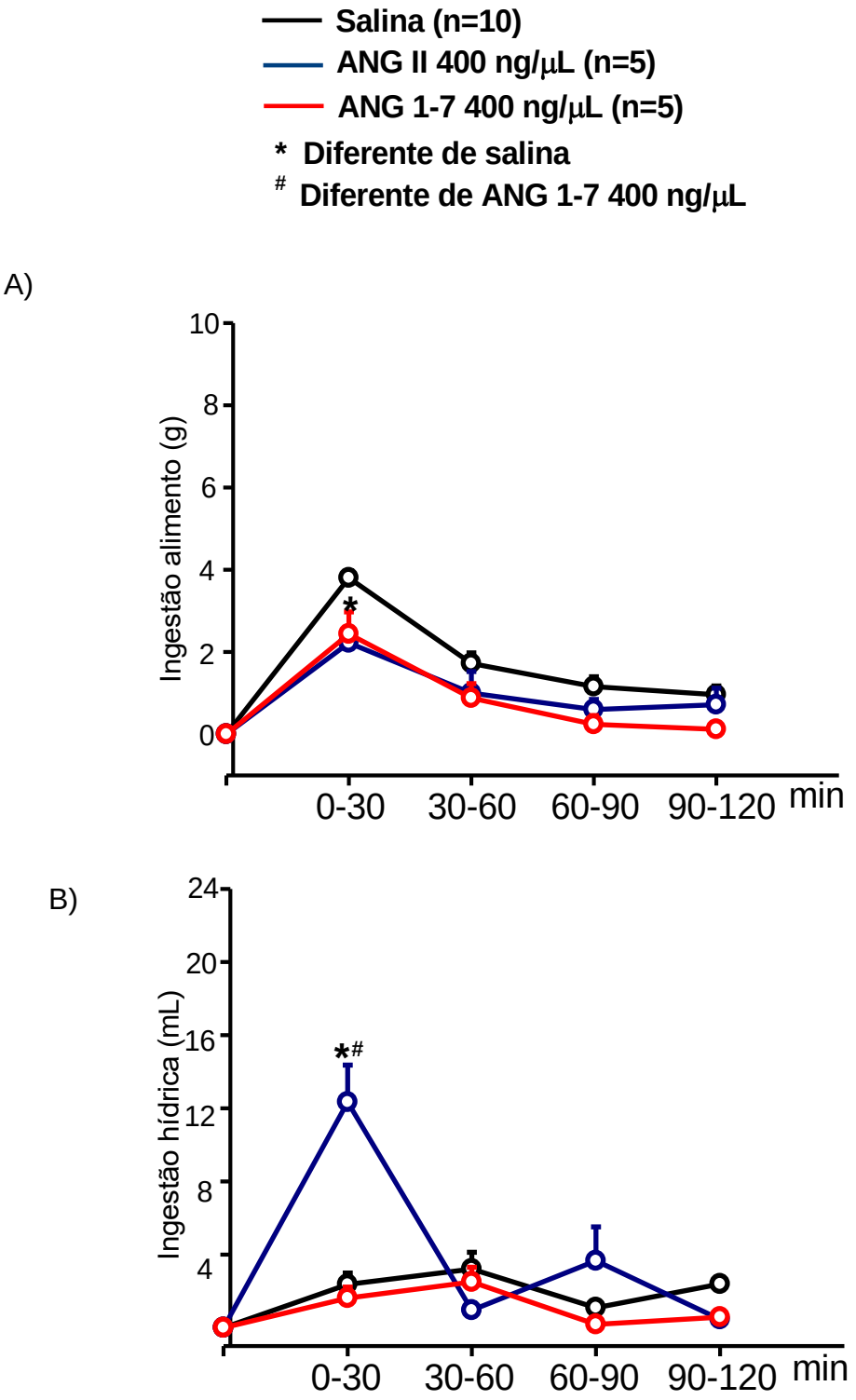

Figura 14: Ingestões de alimento (g) e água (mL) medidas nos intervalos de tempo após injeção icv de ANG II e ANG 1-7 400 ng/µl ou salina (1 µl) em ratos 24 h privados de alimento. As medidas de ingestão foram feitas nos intervalos de 0-30, 30-60, 60-90 e 90-120 min. Os resultados foram expressos em média ± EPM; Salina n=10, ANG II e ANG 1-7 n=5.

6.5 Injeção icv de Losartana, PD 123319 e A779:

6.5.1. Ingestão cumulativa de alimento e água após injeção icv de Losartana, PD 123319 e A779, em ratos 24 h privados de alimento.

Losartana 100 nmoL/μL, injetada no VL, reduziu a ingestão de alimento quando comparada ao grupo controle e A779 3 nmoL/μL para o tempo de 120 minutos. Já em relação à ingestão hídrica, os tratamentos com antagonistas de receptores AT1 e AT2, Losartana (100 nmoL/μL) e PD 123319 (30 nmoL/μL), respectivamente, diminuiram a ingestão de água comparado ao grupo controle e A779 3 nmoL/μL (antagonista de receptor MAS) para os tempos de medida de 90 e 120 minutos. Porém, somente Losartana foi diferente do grupo controle e A779 3 nmoL/μL para o tempo de 60 minutos (**Figura 15**).

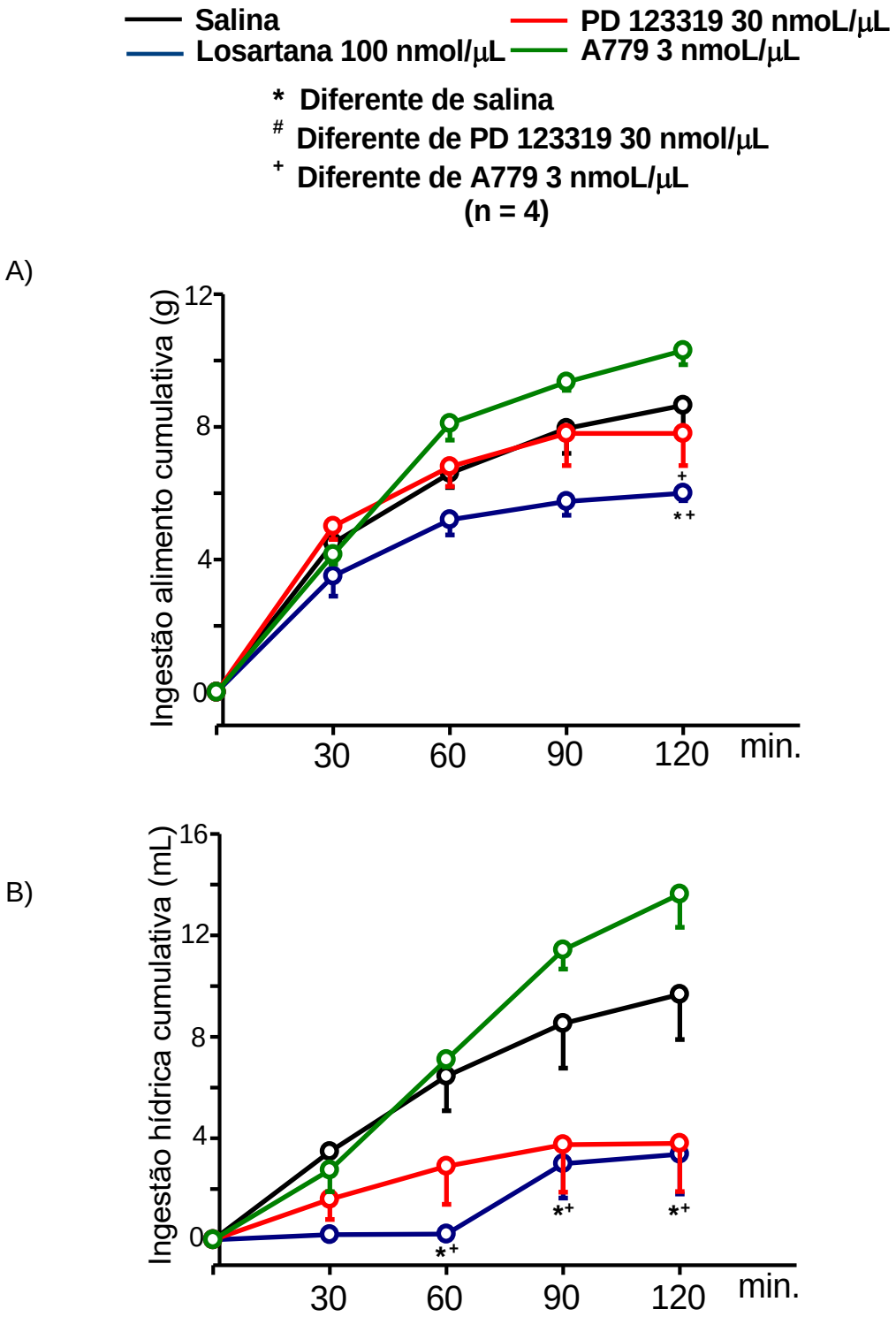

Figura 15: Ingestão cumulativa de alimento (g) e água (mL) após injeção icv de Losartana (100 nmoL/µl), PD 123319 (30 nmoL/µl), A779 (3 nmoL/µl) ou salina (1 µl) em ratos 24 h privados de alimento. As medidas de ingestão foram feitas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 min. Os resultados foram expressos em média ± EPM; n= 4.

6.5.2. Ingestão de alimento e água, medida nos intervalos de tempo, após injeção icv de Losartana, PD 123319 e A779, em ratos 24 h privados de alimento.

Em relação à análise por tempo de medição, pode-se observar que os animais do grupo controle, Losartana 100 nmoL/μL e PD 123319 30 nmoL/μL, antagonistas dos receptores AT1 e AT2, respectivamente, ingeriram menos alimento quando comparados aos animais tratados com A779 3 nmoL/μL, antagonista de receptores MAS, no período de 30-60 minutos. Já em relação à ingestão hídrica, observa-se que com Losartana 100 nmoL/μL os animais beberam menos água quando comparados ao grupo controle para os períodos 0-30 e 30-60 minutos e do tratamento com A779 3 nmoL/μL para o intervalo de 30- 60 minutos. PD 123319 30 nmoL/μL reduziu a ingestão de água quando comparado ao tratamento com A779 3 nmoL/μL, nos períodos de 30-60 e 60-90 minutos.

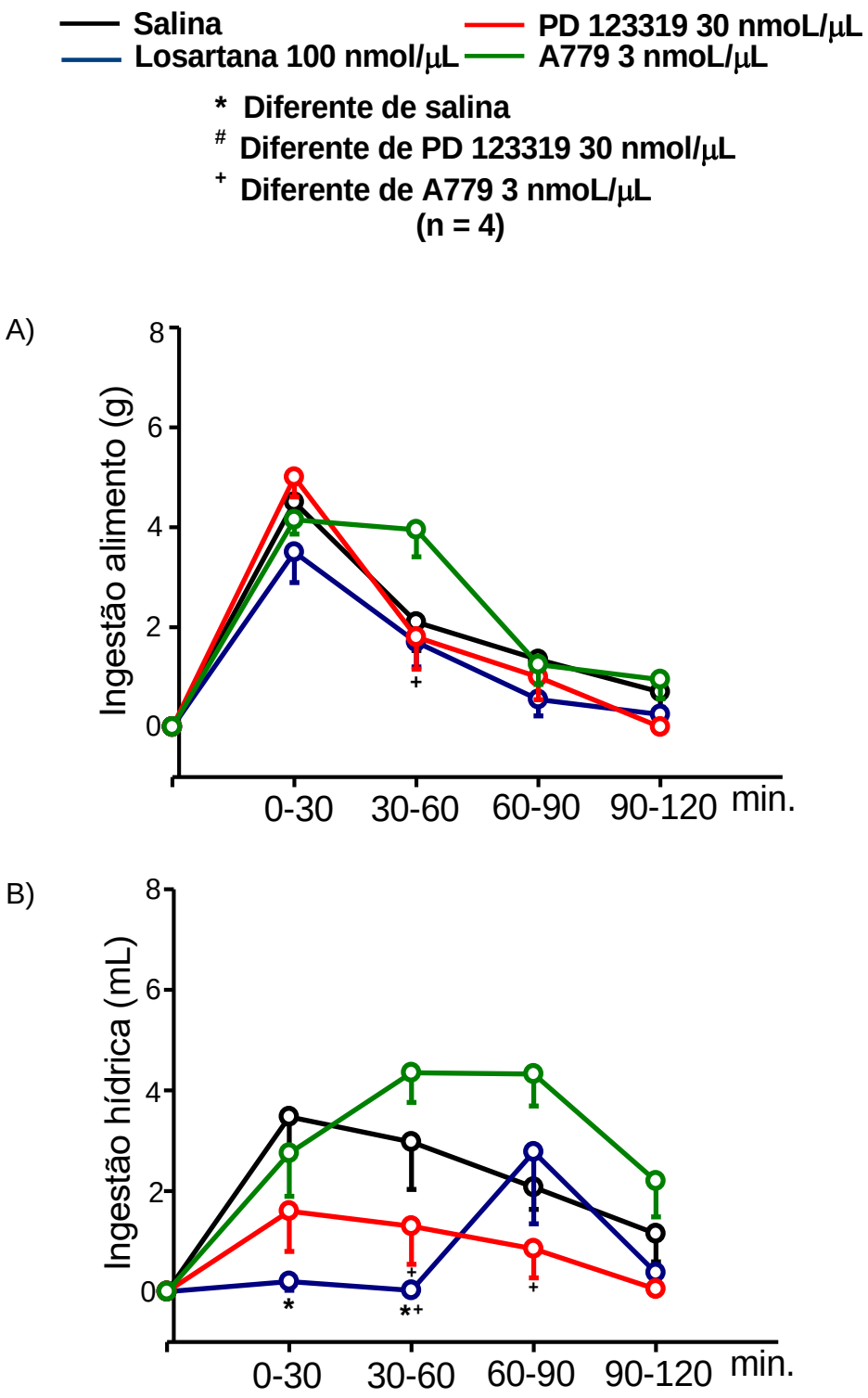

Figura 15: Ingestões de alimento (g) e água (mL) medidas nos intervalos de tempo após injeção icv de Losartana (100 nmoL/μL), PD 123319 (30 nmoL/μL), A779 (3 nmoL/μL) ou salina (1 μl) em ratos 24 h privados de alimento. As medidas de ingestão foram feitas nos intervalos de 0-30, 30-60, 60-90 e 90-120 min. Os resultados foram expressos em média ± EPM; n= 4.

7. DISCUSSÃO:

Os resultados mostraram que ANG II microinjetada no VL promoveu um efeito anoréxico quando administrada na concentração de 400 ng/μL. Já em relação à ingestão hídrica, tratamento com ANG II 200 e 400 ng/μL foi capaz de aumentar a ingestão de água que acompanha a ingestão de alimento quando comparada ao grupo controle. Assim sendo, neste estudo, a dose efetiva da ANG II, em relação à ingestão alimentar e de água, foi 400 ng/μL.

Os resultados estão de acordo com dados da literatura, que mostram tanto uma potente ação dispsogênica, quanto anoréxica, da ANG II (Fitzsimons, 1998; Formenti e Colombari, 2011; Porter e cols, 2003; Porter e Potratz, 2004; Nakano-Tateno e cols, 2012; Yoshida e cols, 2012). Os efeitos da ANG II (efeito anoréxico e sede) foram evidentes para o primeiro intervalo de medida (0-30 min). Uma vez que o animal ou está bebendo água ou ingerindo alimento, seria possível, que a redução da ingestão de alimento promovida pela ANG II fosse uma consequência da sede desencadeada pela mesma. Estudo de Porter e Potratz (2004) mostrou que a infusão icv de ANG II em um grupo de animais com alimento e água *ad libitum*, promoveu perda de peso, gasto energético e ingestão alimentar parecida com a do grupo que tinha alimento *ad libitum*, mas água limitada, sugerindo que a diminuição da ingestão alimentar após injeção de ANG II no VL não estava associada ao aumento da ingestão de água. Assim, seria possível que o mesmo estivesse acontecendo nos animais privados de alimento, sendo que a redução da ingestão de alimento seria independente do aumento da ingestão de água. Todavia para se confirmar esta possibilidade de que a ingestão de água não está interferindo na ingestão de alimento seriam necessários outros experimentos.

A maioria dos estudos para verificar o efeito da ANG II no controle da ingestão alimentar foram tratamentos crônicos, tentando observar a ingestão diária (Nakano-Tateno e cols, 2012; Yoshida e cols, 2012), sendo que este estudo traz um protocolo diferenciado, em que os ratos foram privados de alimento, ou seja, um protocolo no qual a fome foi estimulada. Este protocolo, assim como no de ingestão diária, mostrou que a ANG II promove um efeito anoréxico para ingestão alimentar, quando injetada no VL.

Diferente da ANG II, o tratamento com ANG 1-7, não foi capaz aumentar a ingestão de água. Este dado condiz com a literatura, a qual mostra que a ANG 1-7 não induz a sede, nem o apetite ao sódio (Mahon e cols, 1995; Santos e cols., 1994; Silva e cols., 1998). Já em relação ao comportamento alimentar, até onde sabemos, a literatura não traz a ação da ANG 1-7 na ingestão de alimento. Os resultados obtidos mostraram que a ANG 1-7 na concentração de 400 ng/μL, injetada no VL, promoveu um efeito anoréxico de mesma intensidade que a ANG II, porém houve redução e não aumento da ingestão de água que acompanha a ingestão de alimento. Oh e cols (2012) sugerem um possível envolvimento da ANG 1-7, atuando em receptores MAS, na perda de peso induzida pelo tratamento com captopril, o que considerando os resultados apresentados, poderia em parte ser decorrente do efeito anoréxico da ANG 1-7. Quanto à ingestão de água, haveria duas hipóteses possíveis: a redução da ingestão de água seria uma consequência da redução da ingestão de alimento; ou poderia ser um efeito direto da ANG 1-7 em inibir a ingestão de água, o que colaboraria com o fato dela não ser capaz de induzir a sede (Mahon e cols, 1995), pois talvez ela fosse necessária, participasse das vias neurais, em situações em que este comportamento ingestivo (sede) fosse ativado, com o objetivo de limitá-lo.

Ao fazer uma comparação dos agonistas ANG II e ANG 1-7 na concentração de 400 ng/μL observou-se que ambos foram capazes de reduzir a ingestão de alimento, sem diferenças entre eles. Todavia em relação à ingestão de água, enquanto ANG II estimulou, a ANG 1-7 reduziu esta ingestão. Portanto, ora esses peptídeos apresentam efeitos contrários e ora similares. Embora ambos tenham sidos administrados no VL, e provavelmente atingiram as mesmas áreas periventriculares, seria possível que as vias/circuitos neurais ativados ou inibidos por eles, fossem semelhantes quando o objetivo é limitar a ingestão de alimento (sensação de saciedade), mas fossem diferentes quando o intuito é controlar a ingestão de água.

Estudo de Yoshida e cols (2012) mostraram que administração sistêmica ou icv de ANG II reduz a expressão dos neuropeptídios orexígenos (NPY e orexina) no hipotálamo. Em camundongos knockout para o receptor AT1,

observou-se que eles eram hiperfágicos e apresentavam menor expressão do neuropeptídio anorexígeno CRH (hormônio liberador de corticotrofina) (Yamamoto e cols, 2011) assim sendo, seria possível que ao injetar ANG 1-7 no VL, ela tivesse um efeito similar, e ao reduzir a expressão de substancias orexígenas ou aumentar a expressão das anorexígenas, diminuiria a ingestão de alimento.

Ao analisar o efeito dos antagonistas de receptores AT1 (Losartana) e receptores AT2 (PD 123319) da ANG II e o antagonista de receptores MAS (receptor da ANG 1-7) observou-se que o tratamento com A779 e PD123319 não afetaram a ingestão de alimento, enquanto o tratamento com losartana reduziu a ingestão alimento quando comparados ao grupo controle. Em relação à ingestão de água, tanto PD 123319 quanto losartana reduziram a ingestão de água que acompanha a ingestão de alimento.

Considerando os resultados da ANG 1-7 que reduziu a ingestão de alimento, seria esperado que o tratamento com A779 aumentasse ou não alterasse a ingestão de alimento. A concentração de A779 utilizada foi uma concentração capaz de inibir a ingestão de água induzida por desidratação intracelular (Silva e cols, 2014), porém como observado, não afetou nem a ingestão de água nem a de alimento induzida por privação.

Quanto aos receptores AT2 já foi demonstrada sua participação na regulação da ingestão alimentar e na sede. Estudos já demostraram que a administração icv de um agonista AT2 exerce um efeito hipofágico (Yoshikawa e cols, 2012) e em animais knockout para receptores AT2 não foi observado o efeito hipofágico da ANG II (Ohinata, 2008). Além disso, Nakano-Tateno e cols (2012) mostraram que o prévio tratamento com PD 123319 (antagonista dos receptores AT2) aboliu a redução da ingestão alimentar promovida pela ANG II injetada no VL. Nos presentes resultados, o bloqueio dos receptores AT2 (PD 123319) não interferiu na ingestão de alimento, embora tenha sido capaz de reduzir a ingestão de água. Nakano-Tateno (2012) mostraram que o tratamento com PD 123319 aboliu o efeito da ANG II em relação à ingestão de água que acompanha a ingestão de alimento. Além disso, a participação dos receptores

AT2 na ingestão de água já foi observada em outros estudos (Saad e Camargo, 2003; Camara e Osborn, 2001).

Quanto à losartana, estudos com camundongo knockout para o receptor AT1 mostraram que os animais ficaram hiperfágicos e a redução da ingestão alimentar desencadeada pela administração de ANG II icv foi atenuada (Yamamoto e cols, 2011; Ohinata e cols, 2008). Ademais, o pré-tratamento com losartana aboliu o efeito hipofágico da ANG II (Nakano-Tateno, 2012). Assim seria esperado que a losartana ou aumentasse a ingestão de alimento ou não interferisse na mesma. Todavia, o resultado observado foi que a losartana teve um efeito similar a do seu agonista (ANG II), uma redução da ingestão de alimento. É importante ressaltar que a concentração de losartana utilizada foi aproximadamente 250 vezes maior do que a de ANG II (~0,4 nmol/1 μL x losartana: 100 nmol/1 μL), o que poderia estar contribuindo para uma ação inespecífica da mesma. Estudos já demonstraram um efeito hipofágico por parte dos antagonistas de receptores AT1. Tratamento com telmisartana (antagonista de receptor AT1) combinado com uma dieta com alto teor de gordura reduziu a ingestão de alimento e o peso corporal em relação ao grupo controle (Auberta e cols 2010; Noma e cols, 2011). Auberta e cols (2010) demonstraram ainda que o efeito anorexigênico da telmisartana era independente do receptor AT1. Além disso, já foi demonstrado um efeito hipofágico de outros antagonistas AT1, como a candesartana e irbesartana (Muller-Fielitz e cols, 2011; Voight e cols, 2007). Segundo Muller-Fielitz e cols (2011) a hipofagia observada não seria uma ação geral dos bloqueadores AT1 uma vez que este efeito só foi observado após a administração de altas doses do mesmo (candesartana), mas não após a administração de doses normais ou moderadamente acima do normal. Benson e cols (2004) demonstraram, *in vitro*, uma atividade agonista do receptor γ ativado pelo proliferador de peroxissomo (PPAR), da telmisartana que seria independente do receptor AT1. Portanto, seria possível, que o efeito anorexígeno observado por estes antagonistas de receptores AT1, não seja via AT1. Todavia, a redução da ingestão de água, é um efeito clássico do bloqueio dos receptores AT1. A ingestão de água produzida pela injeção icv de solução hipertônica de NaCl ou

privação hídrica foi reduzida ou abolida quando estudada em animais tratados com injeção icv de losartana (antagonista dos receptores AT_1 da ANG II) (Fitzsimons, 1980; Fitzsimons, 1981; Blair-West e cols., 1994; Weisinger e cols., 1996; Fitzsimons, 1998; Findlay, 1996; Saad e Camargo, 2003; Camara e Osborn, 2001). Em trabalho associando ingestão de alimento e de água (período escuro do ciclo claro-escuro) Nakano-Tateno e cols (2012) mostraram que camundongos tratados com ANG II apresentaram um aumento na ingestão de água na primeira hora pós injeção icv e uma redução entre a sétima e nona horas, sendo que a losartana inibiu apenas o efeito facilitador da ANG II sobre a ingestão de água. Em outras palavras, a redução da ingestão de água que acompanha à ingestão de alimento nos animais privados, era um resultado esperado.

Em resumo, os resultados mostraram um potente efeito hipofágico da ANG II e ANG 1-7 com efeitos opostos na ingestão de água que acompanha a ingestão de alimento. Todavia, novos experimentos deverão ser feitos para se confirmar a inabilidade dos antagonistas em aumentar a ingestão de alimento, como, por exemplo, a interação entre os agonistas e antagonistas.

8. CONCLUSÃO:

ANG II e ANG 1-7, atuando nas áreas periventriculares prosencefálicas, apresentam um efeito hipofágico em ratos privados de alimentos por 24h.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Abbott C.R, Monteiro M, Small C.J et al. The inhibitory effects of peripheral administration of peptide YY 3-36 and glucagon-like peptide-1 on food intake are attenuated by ablation of the vagal-brainstem-hypothalamic pathway. **Brain Research.** 1044 (1): 127–131, 2005.

Andrade J.M[1], Lemos F.O[2], da Fonseca Pires S[3], Millán R.D[4], de Sousa FB[4], Guimarães A.L[5], Qureshi M[6], Feltenberger J.D[6], de Paula A.M[5], Neto J.T[7], Lopes M.T[2], Andrade H.M[3], Santos R.A[8], Santos S.H[9]. Proteomic white adipose tissue analysis of obese mice fed with ahigh-fat diet and treated with oral angiotensin-(1–7). **Peptides**. 60:56-62, 2014.

Auberta G, Burnierb M, Dullooc A,Perregauxb C, Mazzolaid L, Pralonga F, Zanchib A. Neuroendocrine characterization and anorexigenic effects of telmisartan in diet- and glitazone-induced weight gain. **Metabolism Clinical and Experimental**. 59: 25–32, 2010.

Bailey E.F. A tasty morsel: the role of the dorsal vagal complex in the regulation of food intake and swallowing. Focus on “BDNF/TrkB signaling interacts with GABAergic system to inhibit rhythmic swallowing in the rat, by Bariohay et al. **The American Journal of Physiology**. 295 (4): 1048–1049, 2008.

Benarroch E.E. Neural control of feeding behavior: overview and clinical correlations. **Neurology**. 74 (20): 1643–1650, 2010.

Benson, S.C, Pershadsingh, H.A, Ho C.I, Chittiboyina A, Desai P, Pravenec M, Qi N, Wang J, Avery M.A, Kurtz T.W. Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPARgamma-modulating activity. **Hypertension**. 43: 993–1002, 2004.

Blair-West J.R, Burns P, Denton D.A, Ferraro T.M, Mcburnie M.I, Tarjan E and Weisinger R.S. Thirst induced by increasing brain sodium concentration is mediated by brain angiotensin. **Brain Res**. 637: 335-338, 1994.

Botelho L.M, Block C.H, Khosla M.C, Santos R.A.S. Plasma angiotensin-(1-7) levels is increased by water deprivation, salt load and hemorrhage. **Peptides**. 15 (4):723-9, 1994.

Bray, G. A., Fisler, J. & York, D. A. Neuroendocrine control of the development of obesity: understanding gained from studies of experimental animal models. ***Front. Neuroendocrinol***. 11: 128–181, 1990.

Brink M, Price S.R, Chrast J, Bailey J.L, Anwar A, Mitch W.E, De- lafontaine P. Angiotensin II induces skeletal muscle wasting through enhanced protein degradation and down-regulates auto- crine insulin-like growth factor I. **Endocrinology**. 142:1489–1496, 2001.

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

Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hokfelt T. The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 95 (25): 15043–15048, 1998.

Camara A.K, Osborn J. Central AT1 and AT2 receptors mediate chronic intracerebroventricular angiotensin II-induced drinking in rats fed high sodium chloride diet from weaning. **Acta Physiol Scand.** 171 (2):195-201, 2001.

Campagnole-Santos M.J, Heringer S.B, Batista E.N, Khosla M.C, Santos R.A. Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. **Am J Physiol**. 263: 89–94, 1992.

Campbell D.J, Zeitz C.J, Esler M.D and Horowitz J.D. Evidence against a major role for angiotensin converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) in angiotensin peptide metabolism in the human coronary circulation. **Journal of Hypertension**. 22 (10): 1971–1976, 2004.

Chappell M.C, Pirro N.T, Sykes A and Ferrario C.M. Metabolism of angiotensin-(1–7) by angiotensin-converting enzyme. **Hypertension**. 31(1): 362–367, 1998.

Clark J.T, Kalra P.S, Crowley W.R, Kalra S.P. Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. **Endocrinology**. 115: 427-429, 1984.

Clement, K. et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. **Nature**. 392: 330–331, 1998.

Coelho M.S, Lopes K.L, Freitas R.A, de Oliveira-Sales E.B, Bergasmaschi C.T, Campos R.R , Casarini D.E, Carmona A.K, Araújo M.S , Heimann J.C, Dolnikoff M.S. High sucrose intake in rats is associated with increased ACE2 and angiotensin-(1–7) levels in the adipose tissue. **Regulatory Peptides**. 162: 61–67, 2010.

Date Y, Murakami N, Toshinai K et al. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. **Gastroenterology**. 123 (4): 1120–1128, 2002.

Di Nicolantonio R., Weisinger R.S. Feeding and drinking behavior following angiotensin converting enzyme blockade: role of injectant pH. **Pharmacol. Biochem. Behav**. 29: 547–551, 1988.

Dzau V.J. Review Implications of local angiotensin production in cardiovascular physiology and pharmacology. **Am J Cardiol**. 59 (2): 59A-65A, 1987.

Ferreira A.J, Santos R.A, Almeida A.P. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. **Hypertension**. 38: 665-668, 2001.

Findlay A.L. The effect of losartan on drinking and NaCl intake in the rat in response to hyperosmotic and hypovolaemic stimuli: effect of route of administration and strain of rat. **Regul Pept.** 66 (1-2): 95-100, 1996.

Fitzsimons J.T. Angiotensin, thrist and sodium appetite. **Physiol Rev**. 38 (3): 583-686, 1998.

Fitzsimons, J.T. Angiotensin stimulation of the central nervous system. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.** 87:117-167, 1980.

Formenti S, Colombari E. Mecanismos neuro-hormonais envolvidos na regulação do apetite ao sódio: alguns aspectos. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**. 36 (3): 160-167, 2011.

Garcia N.H, Garvin J.L. Angiotensin-(1-7) has a biphasic effect on fluid absorption in the proximal straight tubule. **J Am Soc Nephrol**. 5: 1133-8, 1994.

Giani J.F, Mayer M.A, Munoz M.C, Silberman E.A, Höcht C, Taira C.A et al. Chronic infusion of angiotensin-(1–7) improves insulin resistance and hypertension induced by a high-fructose diet in rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 296: 262–71, 2009.

Grill H.J. and Kaplan J.M, The neuroanatomical axis for control of energy balance. **Frontiers in Neuroendocrinology**. 23 (1): 2–40, 2002.

Guyton A.C, Hall J.E. Unit XIII Metabolism and temperature regulation: Dietary Balances; Regulation of Feeding; Obesity and Starvation; Vitamins and Minerals. **Textbook of medical Physiology**. 71: 867-872, 2006.

Hasser E.M, Cunningham J.T, Sullivan M.J, Curtis K.S, Blaine E.H and Hay M. Area Postremaand Sympathetic Nervous System Effects of vasopressin and angiotensin II. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. 27: 432–436, 2000.

Johnston C.I, Burrell L.M, Perich R, Jandeleit K, Jackson B. Review The tissue renin-angiotensin system and its functional role. **Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl**. 19: 1-5, 1992.

Koda S, Date Y, Murakami N et al. The role of the vagal nerve in peripheral PYY3-36-induced feeding reduction in rats. **Endocrinology**. 146 (5): 2369–2375, 2005.

Kristensen P, Judge M.E, Thim L, Ribel U, Christjansen K.N, Wulff B.S, Clausen J.T, Jensen P.B, Madsen O.D, Vrang N, Larsen P.J, Hastrup S. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. **Nature**. 393: 72-76, 1998

Kucharewicz I, Pawlak R, Matys T, Chabielska E, Buxzko W. Angiotensin- (1-7): na active member of the renin-angiotensin system. **Journal of Physiology and Phamacology**. 53 (4): 533-540, 2002

Leibowitz SF, Wortley KE. Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions**. Peptides**. 25: 473– 504, 2004.

Lent R. Motivação para Sobreviver: Hipotálamo, Homeostasia e o Controle dos Comportamentos Motivados; **Em Cem Bilhões de neurônios: conceitos fundamentais em neurociências**. Editora: Atheneu. 15: 533-557, 2010

Leung P.S, de Gasparo M. Involvement of the pancreatic renin–angiotensin system in insulin resistance and the metabolic syndrome. **J Cardiometa Syndr**. 1: 197–203, 2006.

Lima C.V, Paula R.D, Resende F.L, Khosla M.C, Santos R.A. Potentiation of the hypotensive effect of bradykinin by short-term infusion of angiotensin-(1-7) in normotensive and hypertensive rats. **Hypertension***.* 30: 542-548, 1997.

Li P, Chappell M.C, Ferrario C.M, Brosnihan K.B. Angiotensin-(1-7) augments bradykinininduced vasodilation by competing with ACE and releasing nitric oxide. **Hypertension***.* 29: 394-400, 1997.

Mahon J M, Allen M, Hernert J and Fitzsimons J.T. The association of thirst, sodium appetite and vasopressin release with c-fos expression in the forebrain of the rat after intracerebroventricular injection of angiotensin II, angiotensin- (1-7) or carbachol. **Neuroscience**. 69 (1): 199-208, 1995.

Mayer J, Thomas D.W. Regulation of food intake and obesity. **Science***.* 156: 328-337, 1967.

Müller-Fielitz H, Markert A, Wittmershaus C, Pahlke F, Jöhren O, Raasch W. Weight loss and hypophagia after high-dose AT1-blockade is only observed after high dosing and depends on regular leptin signalling but not blood pressure. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** 383(4):373-84, 2011.

Nakano-Tateno T, Shichiri M, Suzuki-Kemuriyama N, Tani Y, Izumiyama H, Hirata Y. Prolonged effects of intracerebroventricular angiotensin II on drinking, eating and locomotor behavior in mice. **Regulatory Peptides**. 173: 86–92, 2012.

Noma K, Toshinai K, Koshinaka K, Nakazato M. Telmisartan suppresses food intake in mice via the melanocortin pathway. **Obesity Research & Clinical Practice**, 5: 93–100, 2011.

Oh Y.B, Kimb J.H, Parka B.M, Parkc B.H, Kim S.H. Captopril intake decreases body weight gain via angiotensin-(1–7). **Peptides**. 37: 79–85, 2012.

Ohinata K, Fujiwara Y, Fukumoto S, Iwai M, Horiuchi M, Yoshikawa M. Angiotensin II and III suppress food intake via angiotensin AT(2) receptor and prostaglandin EP(4) receptor in mice. **FEBS Lett.** 582(5): 773-7, 2008.

Pinheiro S.V.B and Silva A.C.S. Angiotensin Converting Enzyme 2, Angiotensin-(1-7), and Receptor Mas Axis in the Kidney. **International Journal of Hypertension**, 2011.

Porter J.P, Anderson J.M, Robison R.J and Phillips A.C. Effect of central angiotensin II on body weight gain in young rats. **Brain Res**. 959: 20–28, 2003.

Porter J.P and Potratz K.R. Effect of intracerebroventricular angiotensin II on body weight and food intake in adult rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 287: 422–428, 2004.

Raasch W, Markert A, Wittnershaus C, Jöhren O, Dominiak P. Weight loss after AT1-blockade is correlated to a downregulation of orexigenic peptides in the hypothalamus. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol**. 372: 68, 2006.

Raposinho PD, Pedrazzini T, White RB, Palmiter RD and Aubert ML. Chronic Neuropeptide Y Infusion into the Lateral Ventricle Induces Sustained Feeding and Obesity in Mice Lacking Either *Npy1r* or *Npy5r* Expression. **Endocrinology, January.** 145(1): 304–310, 2004.

Raposinho PD, Pierroz DD, Broqua P, White RB, Pedrazzini T, Aubert ML. Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle ofC57BL/6J male mice produces an obesity syndrome including hyperphagia, hyperleptinemia, insulin resistance, and hypogonadism. **Mol Cell Endocrinol** 185:195–204, 2001.

Rinaman L. Ascending projections from the caudal visceral nucleus of the solitary tract to brain regions involved in food intake and energy expenditure. **Brainresearch**. 1350: 18-34, 2010.

Rinaman, L. Postnatal development of hypothalamic inputs to the dorsal vagal complex in rats. **Physiology and Behavior**. 79: 65–70. 2003.

Saad W.A, Camargo L.A. Influence of angiotensin II receptor subtypes of the paraventricular nucleus on the physiological responses induced by angiotensin II injection into the medial septal area. **Arq Bras Cardiol.** 80(4): 396-405, 2003.

Santos E.L, de Picoli Souza K, da Silva E.D, Batista E.C, Martins P.J.F, D'Almeida V, Pesquero J.B. Long term treatment with ACE inhibitor enalapril

decreases body eight gain and increases life span in rats. **Biochemical Pharmacology**. 78: 951–958, 2009.

Santos R.A.S, Baracho N.C.V. Angiotensin-(1-7) is a potent an- tidiuretic peptide in rats. **Braz J Med Biol Res.** 25: 651-4, 1992.

Santos R.A , Campagnole-Santos M.J. Central and peripheral actions of angiotensin-(1-7). **Braz J Med Biol**. 27: 1033-47, 1994.

a - Santos E.L, de Picoli Souza K, Cibrian-Uhalte E, Oliveira S.M, Bader M, Costa-Neto C.M, et al. Essential role of TM V and VI for binding the C-terminal sequences of Des-Arg-kinins. **Int Immunopharmacol**. 8: 282–288, 2008.

b - Santos E.L, de Picoli Souza K, Guimarães P.B, Reis F.C.G, Costa-Neto C.M, Luz J, et al. Effect of angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on body weight and composition in young rats. **Int Immunopharmacol**. 8: 247–253, 2008.

Santos S.H.S, Braga J.F, Mario É.G, Pôrto L.C.J, Rodrigues-Machado M.G, Murari A et al. Improved lipid and glucose metabolism in transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1–7). **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 30: 953–61, 2010.

Schiavone M.T, Santos R.A.S, Brosnihan K.B, Khosla M.C, Ferrario C.M. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypo-physial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. **Proc Natl Acad Sci USA**. 85: 4095-4098, 1988.

Schwartz MW, Woods SC, Porte Jr D, Seeley RJ, Baskin DG**.** Central nervous system control of food intake**. Nature**. 404: 661– 671, 2000.

Schwartz T.W, Holst J.J, Fahrenkrug J et al. Vagal, cholinergic regulation of pancreatic polypeptide secretion. **The Journal of Clinical Investigation**. 61(3): 781–789, 1978.

Silva A.C.S, Belloa A.P.C, Barachoa N.C.V, Khoslab M.C, Santos R.A.S Diuresis and natriuresis produced by long term administration of selective Angiotensin-(1–7) antagonist in normotensive and hypertensive rats. **Regulatory Peptides.** 74:177–184, 1988.

Silva,M.T.H, Alzamora,A.C, Dos Santos,S.R.A, Campagnole-Santos, M. J, De Oliveira,L.B. **Envolvimento dos receptores MAS da angiotensina 1-7 na sede indusiza por desidratação intracelular**. Trabalho apresentado no XVIII simpósio brasileiro de fisiologia cardiovascular, Londrina/PR, 2014.

Stanley BG, Kyrkouli SE, Lampert S, Leibowitz SF. Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. **Peptides**. 7:1189–1192, 1986.

Stanley S, Wynne K, McGowan B, Bloom S. Hormonal regulation of food intake. **Physiological Reviews**. 85 (4): 1131–1158, 2005.

Suplicy H.L. Obesidade visceral, resistência à insulina e hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens**. 2: 136-41, 2000.

Suzuki K, Jayasena C.N, Bloom S.R. Obesity and Appetite Control. **Experimental Diabetes Research**, 2012.

Suzuki K, Simpson K.A, Minnion J.S, Shillito J.C, Bloom S.R. The role of gut hormones and the hypothalamus in apetite regulation. **Endocrine Journal**. 57 (5): 359-372, 2010.

Tateno T.N, Shichiri M, Kemuriyama N.S, Tani Y, Izumiyama H, Hirata Y. Prolonged effects of intracerebroventricular angiotensin II on drinking, eating and locomotor behavior in mice. **Regulatory Peptides.** 173: 86–92, 2012.

van der Kooy D. Area postrema: site where cholecystokinin acts to decrease food intake. **Brain Research**. 295 (2): 345–347, 1984.

Velkoska E, Warner F.J, ColeT.J, Smith I, Morris M.J. Metabolic effects of low dose angiotensin onverting enzyme inhibitor in dietary obesity in the rat. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**. 20: 49-55, 2010.

Vickers C, Hales P, Kaushik V et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. **Journal of Biological Chemistry**. 277 (17): 14838–14843, 2002.

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

Weisinger R.S, Blair-West J.R, Burns P, Denton D.A, Mckinley M.J and Tarjan E. The role of angiotensin II in ingestive behaviour: A brief review of angiotensin II, thirst and Na appetite. **Regulatory Peptides**. 66: 73-81, 1996.

Yamamoto R, Akazawa H, Fujihara H, Ozasa Y, Yasuda N, Ito K, Kudo Y, Qin Y, Ueta Y and Komuro I. Angiotensin II Type 1 Receptor Signaling Regulates Feeding Behavior through Anorexigenic Corticotropin-releasing Hormone in

Hypothalamus. **The Journal of biological chemistry**. 286 (24): 21458-65, 2011.

Yoshida T, Semprun-Prieto L, Wainford R.D, Sukhanov S, Kapusta D.R, and Delafontaine P. Angiotensin II Reduces Food Intake by Altering Orexigenic Neuropeptide Expression in the Mouse Hypothalamus. **Endocrinology**. 153(3):1411–1420, 2012.

Yoshikawa M, Ohinata K, Yamada Y. The pharmacological effects of novokinin; a designed peptide agonist of the angiotensin AT2 receptor. **Curr Pharm Des**. 19(17): 3009-12, 2013.

Young A.A. Brainstem sensing of meal-related signals in energy homeostasis. **Neuropharmacology**. 63: 31-45, 2012.

Yvan-Charvet L, Quignard-Boulangé A. Role of adipose tissue renin-angiotensin system in metabolic and inflammatory diseases associated with obesity. **Kidney Int**. 79 (2):162-168, 2011.

10. ANEXO:

ANEXO 1: Ingestão cumulativa de alimento (g) e água (mL) após injeção icv de losartana 50, 100 e 150 nmoL/1μL ou salina (1 μl) em ratos 24 h privados de alimento.

Tratamento/tempo	30´	60´	90´	120´
		ALIMENTO		
Salina	4,6±0,2	6,8±0,3	7,6±0,2	7,6±0,2
Losartana 50	4,1±0,3	5,6±0,7	6,6±0,9	6,6±0,9
Losartana 100	4,2±0,6	5,4±0,3	5,5±0,3*	5,5±0,3*
Losartana 150	3,8±0,6	4,8±0,7	4,8±0,7*	4,8±0,7*
		ÁGUA		
Salina	1,6±1,0	4,7±1,5	5,7±2,0	6,2±2,2
Losartana 50	1,5±0,9	3,3±1,7	4,9±1,7	6,0±2,5
Losartana 100	2,0±1,2	2,6±1,5	2,6±1,5	2,6±1,5
Losartana 150*#	0,04±0,02	0,3±0,3	0,3±0,3	0,9±0,5

As medidas de ingestão foram feitas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 min. Os resultados foram expressos em média ± EPM; n= 5; * diferente de salina; # diferente de losartana 50 nmol.