



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE FISIOLOGIA ENDÓCRINA E CARDIOVASCULAR



AÇÃO HIPOFÁGICA DA ANG II: ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES AT1 E AT2

Hellen Lorena Vieira Campos

Ouro Preto/MG

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE FISILOGIA ENDÓCRINA E CARDIOVASCULAR



AÇÃO HIPOFÁGICA DA ANG II: ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES AT1 E AT2

Orientanda: Hellen Lorena Vieira Campos

Orientadora: Pr^a. Dr^a Carla Speroni Ceron

Co-orientadora: Pr^a. Dr^a Lisandra Brandino de Oliveira

Monografia apresentada a Escola de Farmácia (EFAR) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Ouro Preto/MG

2021

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

C198a Campos, Hellen Lorena Vieira .
Ação hipofágica da ANG II [manuscrito]: envolvimento dos
receptores AT1 e AT2. / Hellen Lorena Vieira Campos. - 2021.
50 f.: il.: color., gráf..

Orientadora: Profa. Dra. Carla Speroni Ceron.
Coorientadora: Profa. Dra. Lisandra Brandino de Oliveira .
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto.
Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Angiotensina II. 2. Hipofagia. 3. Receptor Tipo 1 de Angiotensina.
4. Receptor Tipo 2 de Angiotensina. I. Ceron, Carla Speroni. II. Oliveira ,
Lisandra Brandino de. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 612

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787

07/09/21, 13:44

SEI/UFOP - 0218110 - Folha de aprovação do TCC



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

Hellen Lorena Vieira Campos

Ação hipofágica da ANG II: envolvimento dos receptores AT1 e AT2

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia

Aprovada em 30 de agosto de 2021.

Membros da banca

Carla Speroni Ceron (Orientadora)
Doutora - Universidade Federal de Ouro Preto
Lisandra Brandino de Oliveira (Coorientadora)
Doutora - Universidade Federal de Alfenas
Carina Aparecida Fabricio de Andrade (Examinadora)
Doutora – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Milede Hanner Saraiva Paes (Examinadora)
Mestre - Universidade Federal de Ouro Preto

Carla Speroni Ceron (orientadora do trabalho) e Lisandra Brandino de Oliveira (coorientadora do trabalho) aprovaram a versão final e autorizam seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 03/09/2021.



Documento assinado eletronicamente por Carla Speroni Ceron, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR, em 07/09/2021, às 13:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0218110 e o código CRC 21912AF1.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia Endócrina e Cardiovascular (LFEC) em parceria com o Laboratório de Hipertensão (LH), pertencentes ao Departamento de Ciências Biológicas (DCBI) localizado no Instituto de Ciências Exatas e Biológicas (ICEB) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), com o auxílio do CNPq, UFOP e INCT Nanobiofarmacêutica.

“Tenho em mim todos os sonhos do mundo.”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

A Deus,

Pelo dom da vida e por me sustentar até aqui.

Aos meus pais,

Por me acolherem neste mundo com tanto amor e pelos valores ensinados.

A minha tia Marlene,

Por sua dedicação a minha família ao longo de todos esses anos e por me ajudar na realização dos meus sonhos. Sou eternamente grata.

As minhas irmãs, Rafaella e Sthefany,

Por serem anjos neste mundo e por compreenderem a minha ausência ao longo desses anos.

A Prof^a. Dr^a Lisandra Brandino de Oliveira,

Pela amizade, orientação e confiança ao longo de todos esses anos.

A Msc. Milede,

Por aceitar participar da banca e assim, contribuir com este trabalho.

A Prof^a. Dr^a Carina Aparecida Fabrício de Andrade,

Por aceitar participar da banca e assim, contribuir com este trabalho.

A Prof^a. Dr^a Carla Speroni Ceron,

Por aceitar ser minha orientadora.

A Renata,

Pela amizade e por compartilhar as alegrias e dificuldades.

Ao Msc. Marccone,

Pela amizade e conselhos ao longo de todos esses anos.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Cardiovascular (LFEC),

Giovana, Andressa, Paula, João Lucas, Daiane, Jaqueline, Flávio e Marcos pela convivência.

As amizades que conquistei em Ouro Preto,

Tahis Mares, Taynara, Thays Duarte, Karina, Ana e Danielli.

RESUMO

Já foi demonstrado que os mecanismos angiotensinérgicos são importantes na manutenção da homeostase corporal, participando da regulação de comportamentos ingestivos. Tanto a angiotensina II (ANG II) quanto a ANG (1-7), agindo centralmente, reduzem a ingestão de alimento induzida por privação. Sabendo do efeito semelhante da ANG II e da ANG (1-7) na ingestão de alimento induzida, foi investigado se o efeito hipofágico da ANG II seria via receptores AT1 e/ou AT2 e uma possível interação da mesma com as vias centrais da ANG (1-7). Para tanto, foram utilizados ratos Wistar machos (~300-320g), com implante de uma cânula guia encefálica em direção ao ventrículo lateral (VL). Cinco dias após a cirurgia central, iniciaram-se os experimentos. A ração, mas não a água, foi retirada dos animais por 24 h (privação). Trinta minutos antes do término das 24 h, veículo (PBS) ou antagonistas dos receptores da ANG II (AT1: Losartana - 50 nmol/ μ L; AT2: PD 123319 - 30 nmol/ μ L) ou da ANG (1-7) (MAS: A779 - 3 nmol/ μ L) foram injetados no VL. Após 15 min, ANG II (400 ng/ μ L) ou PBS foram também injetados. Em outro protocolo, 15 min antes do término das 24 h de privação, apenas PBS ou Losartana (50 nmol/ μ L); PD 123319 (30 nmol/ μ L); A779 (0,5 e 3 nmol/ μ L) foram injetados no VL. Em ambos os protocolos, 15 min após a última injeção central, água e ração foram oferecidas aos animais, e as medidas de ingestão feitas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 min. Foi sempre aguardado, no mínimo, um intervalo de 48 h entre uma privação e outra. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, análise de variância (ANOVA) de duas vias e o Fisher's LSD (pós-teste) foram utilizados para análises estatísticas, sendo considerada diferença significativa quando $p < 0,05$. ANG II reduziu a ingestão de alimento induzida por privação (primeiros 30 min do teste de ingestão) e potencializou a ingestão de água associada à ingestão de alimento, sendo estes efeitos abolidos pela Losartana e pelo PD 123319, mas não pelo A779. Além disso, a associação da Losartana e do PD 123319 com a ANG II aumentou a ingestão de alimento no intervalo de 60 a 90 min. Quando apenas os antagonistas foram administrados, o bloqueio dos receptores MAS, mas não dos receptores AT1 e AT2, levou a um aumento da ingestão de alimento e de água associada à ingestão de alimento. Assim, conclui-se que a ANG II apresenta um efeito inibitório para a ingestão de alimento induzida por privação, dependente da ativação dos receptores AT1 e AT2. Ademais, ANG (1-7), mas não ANG II, endógena parece estar envolvida na regulação da ingestão de alimento induzida por privação.

LISTA DE ABREVIATURAS

AgRP: Peptídeo Relativo a Agouti

AGT: Angiotensinogênio

ANG I: Angiotensina I

ANG II: Angiotensina II

ANG (1-7): Angiotensina (1-7)

ANG (1-9): Angiotensina (1-9)

AT1: Receptor Tipo 1 da Angiotensina II

AT2: Receptor Tipo 2 da Angiotensina II

CART: Transcrito Regulado por Cocaína-Anfetamina

ECA I: Enzima Conversora de Angiotensina I

ECA II: Enzima Conversora de Angiotensina II

icv: Intracerebroventricular

NPY: Neuropeptídeo Y

PA: Pressão Arterial

POMC: Pró-opiomelanocortina

SNS: Sistema Nervoso Simpático

SRA: Sistema Renina-Angiotensina

3°V: Terceiro Ventrículo

VL: Ventrículo Lateral

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Protocolos experimentais com as respectivas substâncias e suas concentrações utilizadas nos experimentos.....7
- Figura 2:** Suturas do osso do crânio utilizadas na cirurgia estereotáxica.....11
- Figura 3:** Esquema representando o momento da cirurgia (estereotaxia) até o dia do primeiro jejum, aguardando no mínimo 5 dias do pós-cirúrgico e as 24 h de jejum que antecedem o início do experimento.....12
- Figura 4:** Delineamento do Protocolo Experimental para estudo da interação entre os receptores AT1 e AT2 da ANG II com os receptores MAS das ANG (1-7).....12
- Figura 5:** Delineamento do Protocolo Experimental para estudo do bloqueio dos receptores AT1 (Losartana: 50 nmol/1 µL) e AT2 (PD 123319: 30 nmol/1 µL) da ANG II, MAS (A779: 0,5 e 3 nmol/1 µL) da ANG (1-7).....13
- Figura 6:** Foto de um corte histológico do encéfalo de um rato mostrando a trajetória (T) da cânula guia (seta vermelha) e a (seta preta) o ventrículo lateral (VL).....15
- Figura 7:** Ingestão acumulativa de ração (g) após injeção intracerebroventricular (icv) de PBS (A e E) ou dos antagonistas de receptores AT1 (LOS: 50 nmol/ µL, B e E), AT2 (PD: 30 nmol/ µL, C e E) e MAS (A779: 3,0 nmol/ µL, D e E) + ANG II (400 ng/ µL) em ratos 24 h privados de alimento. As medidas de ingestão foram feitas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos. Os resultados foram expressos como média ± EPM. n = número de animais; LOS = Losartana; PD = PD 123319.....17
- Figura 8:** Ingestão de ração (g) por períodos após injeção intracerebroventricular (icv) de PBS (A e E) ou dos antagonistas de receptores AT1 (LOS: 50 nmol/ µL, B e E), AT2 (PD: 30 nmol/ µL, C e E) e MAS (A779: 3,0 nmol/ µL, D e E) + ANG II (400 ng/ 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 minutos. Os resultados foram expressos como média ± EPM. n = número de animais; LOS = Losartana; PD = PD 123319.....18
- Figura 9:** Ingestão acumulativa de água (mL) após injeção intracerebroventricular (icv) de PBS (A e E) ou dos antagonistas de receptores AT1 (LOS: 50 nmol/ µL, B e E), AT2 (PD: 30 nmol/ µL, C e E) e MAS (A779: 3,0 nmol/ µL, D e E) + ANG II (400 ng/ µL) em ratos 24 h

privados de alimento. As medidas de ingestão foram feitas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. n = número de animais; LOS = Losartana; PD = PD 123319.....20

Figura 10: Ingestão de água (mL) por períodos após injeção intracerebroventricular (icv) de PBS (A e E) ou dos antagonistas de receptores AT1 (LOS: 50 nmol/ μ L, B e E), AT2 (PD: 30 nmol/ μ L, C e E) e MAS (A779: 3,0 nmol/ μ L, D e E) + ANG II (400 ng/ μ L) 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 minutos. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. n = número de animais; LOS = Losartana; PD = PD 123319.....21

Figura 11: Ingestão acumulativa (A e C) e por períodos (B e D) de ração (g) e água (mL), respectivamente, após injeção intracerebroventricular (icv) de PBS ou do antagonista de receptores AT1 (LOS: 50 nmol/ μ L) em ratos 24 h privados de alimento. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. n = número de animais. LOS = Losartana.....22

Figura 12: Ingestão acumulativa (A e C) e por períodos (B e D) de ração (g) e água (mL), respectivamente, após injeção intracerebroventricular (icv) de PBS ou do antagonista de receptores AT2 (PD: 30 nmol/ μ L) em ratos 24 h privados de alimento. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. n = número de animais. PD = PD 123319.....23

Figura 13: Ingestão acumulativa (A e C) e por períodos (B e D) de ração (g) e água (mL), respectivamente, após injeção intracerebroventricular (icv) de PBS ou do antagonista de receptores MAS (A779: 0,5 e 3 nmol/ μ L) em ratos 24 h privados de alimento. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. n = número de animais.....24

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	1
I. i COMPORTAMENTOS INGESTIVOS	1
I.ii SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA – ANGIOTENSINA II (ANG II) E ANGIOTENSINA 1-7 (ANG (1-7)).....	2
I.iii ANGIOTENSINA II E ANGIOTENSINA (1-7) NO COMPORTAMENTO INGESTIVO	4
II. OBJETIVOS	6
II. i OBJETIVO GERAL:	6
II. ii OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	6
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	7
III. i MODELO ANIMAL	7
III. ii VEÍCULO, SUBSTÂNCIAS E FÁRMACOS	8
i. VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS SUBSTÂNCIAS MICROINJETADAS NO VL.....	8
ii. SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS NAS MICROINJEÇÕES INTRACEREBROVENTRICULARES (ICV).....	8
iii. FÁRMACOS UTILIZADOS NAS CIRURGIAS	9
i.v FÁRMACOS UTILIZADOS NA EUTANÁSIA	9
III. iii CONFECÇÃO DOS MATERIAIS UTILIZADOS NA ESTEREOTAXIA.....	9
III. iv CIRURGIA ENCEFÁLICA (ESTEREOTAXIA)	10
III. v MICROINJEÇÕES DE SUBSTÂNCIAS NO VENTRÍCULO LATERAL (VL).....	11
III. vi PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	11
III. vii ANÁLISE HISTOLÓGICA – CONFIRMAÇÃO DO SÍTIO DE MICROINJEÇÃO NO VL	13
III. viii APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	14
IV. RESULTADOS	15
IV. i ANÁLISE HISTOLÓGICA	15

IV. ii	INTERAÇÃO DOS RECEPTORES AT1, AT2 E MAS COM ANG II NA INGESTÃO DE ALIMENTOS EM RATOS PRIVADOS DE ALIMENTO POR 24 H....	15
i.	INGESTÃO DE ALIMENTO APÓS INJEÇÃO ICV DOS ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES AT1, AT2 E MAS ASSOCIADOS À ANG II.....	15
ii.	INGESTÃO DE ÁGUA APÓS INJEÇÃO ICV DOS ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES AT1, AT2 E MAS ASSOCIADOS À ANG II.....	19
IV. iii	BLOQUEIO DOS RECEPTORES AT1 E AT2 DA ANG II, MAS DA ANG (1-7) NA INGESTÃO DE ALIMENTO EM RATOS PRIVADOS DE ALIMENTO POR 24 H22	
i.	INGESTÃO DE ALIMENTO E ÁGUA APÓS INJEÇÃO ICV DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR AT1 DA ANG II	22
ii.	INGESTÃO DE ALIMENTO E ÁGUA APÓS INJEÇÃO ICV DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR AT2 DA ANG II	23
iii.	INGESTÃO DE ALIMENTO E ÁGUA APÓS INJEÇÃO ICV DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR MAS DA ANG (1-7)	24
V.	DISCUSSÃO	25
VI.	CONCLUSÃO	29
VII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

I. INTRODUÇÃO

I. i COMPORTAMENTOS INGESTIVOS

Os distúrbios alimentares ocorrem em proporções epidêmicas (LEIBOWITZ, 2002) e envolvem alterações psicológicas ou falhas nos mecanismos fisiológicos que regulam o estado de equilíbrio entre a saciedade e a fome. Desse modo, a compreensão dos mecanismos centrais envolvidos no controle do apetite é de suma importância.

Os circuitos neurais que participam do controle alimentar bem como do gasto energético estão distribuídos tanto em áreas do prosencéfalo como em áreas posteriores. Os ajustes fisiológicos e comportamentais são essenciais para manter a homeostase do indivíduo. Para esse objetivo têm-se os comportamentos motivados que são impulsos que levam a realização de certos ajustes corporais ou comportamentais (LENT, 2010).

O comportamento alimentar humano é regulado por duas vias: a homeostática, feita pelo hipotálamo, e a hedônica (HARROLD *et al.*, 2012) que envolve vias de recompensas límbicas, sendo mediada pelo prazer e pela sensação de recompensa, por exemplo, o consumo de alimentos palatáveis (alimentos com alto teor de gordura, açúcar e sal) (CORDEIRA *et al.*, 2010).

O hipotálamo é o centro integrador dos comportamentos motivados. Em relação ao comportamento alimentar, essa estrutura é responsável pela homeostase orgânica e manutenção do peso corporal. E ainda, o hipotálamo recebe, interpreta e integra sinais que descreve o estado nutricional do organismo e seu ambiente externo, regulando a ingestão alimentar, gasto energético e metabolismo a partir das informações recebidas (WILLIAMS *et al.*, 2000).

Entre as áreas e núcleos do hipotálamo tem-se o núcleo arqueado que possui duas populações de neurônios envolvidos no controle da ingestão alimentar: a via orexígena, com neurônios que co-expressam o neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo relacionado à Agouti (AgRP), e a via anorexígena, na qual os neurônios co-expressam as pró-opiomelanocortinas (POMC) e o transcrito regulado por cocaína-anfetamina (CART), ambas populações de neurônios que se projetam para o núcleo paraventricular, núcleo lateral e núcleo ventromedial (BROBERGER *et al.*, 1998; GUYTON & HALL, 2006; SUZUKI 2010; 2012). Esses dois últimos quando lesionados levam a inanição e hiperfagia, respectivamente (MAYER & THOMAS, 1967). Além disso, o núcleo ventromedial foi identificado como alvo de ação da leptina, para inibir a alimentação, estimulando ainda o gasto de energia e causando perda de peso (SATOH *et al.*, 1997;

WILLIAMS *et al.*, 2000). Vários fatores periféricos participam da regulação do comportamento alimentar, sendo geralmente liberados como consequência da ingestão de alimento (HARROLD *et al.*, 2012). Entre esses fatores estão os sinais de saciedade produzidos no trato gastrointestinal durante uma refeição, que regula a ingestão alimentar por meio da secreção de alguns hormônios como colecistocinina (CCK), o peptídeo YY (PYY) e peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1) (VALASSI *et al.*, 2008). Também há hormônios pancreáticos envolvidos na redução da ingestão alimentar como: glucagon, amilina e insulina. Outro hormônio é a leptina, secretada pelos adipócitos em proporção a quantidade de gordura corporal armazenada (WOODS *et al.*, 2004) que sinaliza para o núcleo arqueado que modula o equilíbrio energético e crescimento, inibindo a produção dos peptídeos orexígenos como NPY e AgRP (ABIZAID & HORVATH, 2008). Outros fatores associados à ingestão de alimento são sinais de fome desencadeados, por exemplo, pela redução da disponibilidade de glicose, ou aumento da grelina circulante que leva ao aumento no núcleo arqueado da liberação de NPY que inibe a pró-opiomelanocortina (POMC) (CONE *et al.*, 2001).

Os mecanismos envolvidos em uma resposta fisiológica são comumente estudados por meio de estratégias farmacológicas. A microinjeção de substâncias nos ventrículos encefálicos busca verificar se as áreas periventriculares poderiam ou não participar de determinada resposta ou se um determinado mecanismo naquela região poderia ser importante para uma resposta fisiológica. E ainda, microinjeção de substâncias nos ventrículos lateral (VL) e terceiro ventrículo (3ºV) poderiam atingir estruturas hipotalâmicas.

I.ii SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA – ANGIOTENSINA II (ANG II) E ANGIOTENSINA 1-7 (ANG (1-7))

O sistema renina angiotensina é um regulador do volume sanguíneo e da resistência vascular periférica respondendo cronicamente às alterações na pressão arterial (PA). Esse sistema é composto pela renina que é um derivado da pró-renina contida dentro das células justaglomerulares dos rins presentes nas arteríolas aferentes, que ao perceberem uma diminuição da pressão sanguínea ou uma redução de sódio sentida pelas células da mácula densa é liberada. Na circulação, a renina cliva o angiotensinogênio (AGT) que é produzido no fígado obtendo-se a angiotensina I (ANG I) que é fisiologicamente inativa atuando como precursora da angiotensina II (ANG II), sendo esta conversão catalisada por meio da enzima conversora de angiotensina (ECA

I), predominantemente encontrada no endotélio vascular dos pulmões e rins. A ANG II por sua vez, atua nos rins, córtex adrenal, arteríolas e cérebro ao se ligar em seus receptores AT1 e AT2 (FOUNTAIN & LAPPIN, 2021).

A ANG II possui uma atuação essencial no controle da pressão arterial sistêmica via receptores do tipo AT1, causando vasoconstrição (SANTOS *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2009). Esse controle da pressão arterial se deve as suas ações em diferentes tecidos, alterando o tônus vascular, aumentando a atividade do sistema nervoso simpático (SNS) e controle do balanço hidroeletrólítico (FOUNTAIN & LAPPIN, 2021; WEIR & DZAU, 1999). A distribuição dos receptores AT1 parece ser ampla, sendo encontrados no diencéfalo, mesencéfalo, ponte e bulbo, indicando diferentes atuações para a ANG II como neuromediador do controle do balanço de água e eletrólitos, estímulo da secreção de hormônios hipotalâmicos e a regulação do sistema nervoso simpático (SNS) (MACGREGOR *et al.*, 1995). Assim, temos que seus efeitos centrais envolvem elevação da pressão arterial, sede, apetite ao sódio e secreção do hormônio antidiurético (ADH).

Já a atuação da ANG II em seu receptor específico AT2 presente no coração, útero, cérebro e medula adrenal promove vasodilatação, apresentando também ação anti-hipertrófica, antiproliferativa e apoptose, geralmente antagonizando as ações da ANG II no receptor AT1 (AIRES, 2012).

Além da ANG II, e dentre outros peptídeos presentes neste sistema, destaca-se também a angiotensina 1-7 (ANG (1-7)), cujos efeitos geralmente se contrapõem aos da ANG II (KOSTENIS *et al.*, 2005; MACHADO, SANTOS, ANDRADE, 1999). A ANG (1-7) pode ser obtida a partir da ANG II ou da angiotensina 1-9 (ANG (1-9)) por ação da ECA II e ECA I, respectivamente (CAMPBELL *et al.*, 2004; CHAPPELL *et al.*, 1998; DONOGHUE *et al.*, 2000; PINHEIRO & SILVA, 2012; RICE *et al.*, 2004; VICKERS *et al.*, 2002).

A angiotensina (1-7) é o produto majoritário derivado da ANG I por uma via que independe da ECA (SANTOS *et al.*, 2008). Tem-se estudado constantemente a via de formação da ANG (1-7) nos últimos tempos e a ECA II continua a ser a principal enzima formadora desse peptídeo (DONOGHUE *et al.*, 2000; TIPNIS *et al.*, 2000). De acordo com CAMPAGNOLE-SANTOS *et al* (1992) e FONTES *et al* (1994), a ANG (1-7) interagindo com o seu receptor específico MAS apresenta consideráveis ações centrais no controle cardiovascular. Alguns dos efeitos cardiovasculares da ANG (1-7) são aumento da sensibilidade do barorreflexo (CAMPAGNOLE-SANTOS *et al.*, 1992)

e liberação de óxido nítrico (NO) envolvido na dilatação vascular (BROSNIHAN, LI, FERRARIO, 1996; HEITSCH *et al.*, 2001; MACHADO, SANTOS, ANDRADE, 2001; PÖRSTI *et al.*, 1994), ações que visam compensar os efeitos da ANG II. E ainda, segundo estudos de SCHIAVONE *et al* (1988) a ANG (1-7) parece apresentar também efeitos semelhantes ao da ANG II como a secreção de ADH.

I.iii ANGIOTENSINA II E ANGIOTENSINA (1-7) NO COMPORTAMENTO INGESTIVO

Há alguns anos estudos têm demonstrado a participação da ANG II no controle dos comportamentos ingestivos, principalmente de água e sódio (FITZSIMONS, 1980, 1981; 1998; STARBUCK & FITTS, 2001; WEISINGER *et al.*, 1996). Desse modo, pesquisas estão sendo desenvolvidas a fim de elucidar os mecanismos pelos quais a angiotensina II regula os comportamentos ingestivos.

Também, alguns estudos demonstraram o papel da ANG II no controle da ingestão alimentar em que, a infusão crônica intracerebroventricular (icv) de ANG II, diminuiu o ganho de peso em animais, tanto por desestimular a ingestão de alimento como por aumentar o gasto energético (PÖRTER *at al.*, 2003; PÖRTER & POTRATZ, 2004). Ademais, a infusão icv de ANG II inibiu a ingestão de alimento basal durante a fase escura do ciclo circadiano do animal, e esse efeito foi abolido pelo bloqueio dos receptores AT₂ e reduzido apenas após algumas horas pelo bloqueio dos receptores AT₁ da ANG II (NAKANO-TATENO *et al.*, 2012), indicando que tanto os receptores AT₂ (mais relevante) quanto AT₁ estão envolvidos no efeito hipofágico da ANG II. Camundongos knockout para receptores AT₁ (tipo 1a) apresentaram um aumento na ingestão alimentar, evidenciando uma via dependente do receptor AT₁a na inibição da fome (YAMAMOTO *et al.*, 2011). Além disso, estudo de YOSHIDA *et al* (2012) também sugeriu a participação dos receptores AT₁ no efeito hipofágico da ANG II, indicando que a ANG II reduz o apetite centralmente, por meio dos receptores AT₁, que intercederia na diminuição da expressão hipotalâmica de NPY e orexina.

Já em relação a ANG (1-7), pouco se sabe sobre seu efeito no comportamento ingestivo. Sabe-se que ela não é capaz de induzir nem a sede, nem o apetite ao sódio em uma condição basal (MAHON *et al.*, 1995). Contudo estudo de DOS-SANTOS *et al* (2017) demonstrou que a ANG (1-7) estimula a ingestão de água após desafios osmóticos (hiperosmolaridade) desencadeados pela privação hídrica e sobrecarga de sódio, independente do aumento da ANG II.

Diferentemente da ANG II, sabe-se pouco sobre a ANG (1-7) e a ingestão de alimento. Todavia, sabe-se que ela apresenta alguns efeitos metabólicos, como por exemplo, a infusão crônica de ANG (1-7) melhora a pressão arterial e a resistência à insulina (GIANI *et al.*, 2009). Somado a isso, a deficiência do receptor MAS em camundongos pode levar a aumento do tecido adiposo e nos níveis plasmáticos de colesterol, insulina e leptina (SANTOS *et al.*, 2010). E ainda, a ANG (1-7) parece está atuando em receptores MAS na perda de peso induzida pelo tratamento com captopril (OH *et al.*, 2012). Desse modo, conhecendo-se os efeitos metabólicos apresentados pela ANG (1-7) e também que ela poderia estar envolvida na redução de peso corporal (a qual pode ser decorrente de uma redução de ingestão ou aumento do gasto energético), seria possível que a ANG (1-7) tivesse um papel no controle da ingestão alimentar.

Os estudos mencionados anteriormente foram feitos considerando-se basicamente uma ingestão basal e não induzida, sendo que DE MARCHI (2014) demonstrou que tanto a injeção de ANG II quanto de ANG (1-7) no ventrículo lateral (VL) reduz a ingestão de alimento induzida por privação de 24 h, porém se desconhecem quais seriam os receptores envolvidos. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar se o efeito hipofágico da ANG II na ingestão de alimento induzida por privação seria dependente dos receptores AT1 ou AT2 ou de ambos. Além de investigar se os receptores MAS da ANG (1-7) poderiam ter algum envolvimento no efeito hipofágico da ANG II.

II. OBJETIVOS

II. i OBJETIVO GERAL:

Investigar as ações centrais da ANG II na regulação da ingestão de alimento.

II. ii OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Em ratos que foram submetidos à privação de 24 h de alimento, investigar:

i) se o efeito hipofágico central da ANG II (VL) é dependente da ativação dos receptores AT1 e/ou AT2;

ii) se há alguma interação entre a ANG II e o receptor MAS da ANG (1-7) na regulação da ingestão alimentar;

iii) se ANG II ou ANG (1-7) endógenas poderiam ter alguma participação na regulação da ingestão de alimento neste modelo.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III. i MODELO ANIMAL

Neste estudo foram utilizados ratos da espécie *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, machos, adultos, com aproximadamente 12 semanas de vida, pesando entre 300 e 320 g. Os animais foram mantidos no Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), onde foram alojados em caixas coletivas (máximo 4 animais por caixa) e mantidos com ração e água *ad libitum*, sob condições controladas como: ciclo claro-escuro de 12 h: 12 h (luzes acesas às 07:00 h), temperatura de $(23\pm 1^\circ\text{C})$ e umidade (40-60%). Depois foram levados para o Laboratório de Fisiologia Endócrina e Cardiovascular (LFEC) localizado no Instituto de Ciências Exatas e Biológicas II (ICEB II), permanecendo sob as mesmas condições anteriormente descritas. Foi aguardado no mínimo 3 dias antes da realização da cirurgia estereotáxica. Em seguida os animais foram alojados em gaiolas individuais e divididos em 2 grupos experimentais (Figura 1). Todos os procedimentos passaram pela aprovação prévia da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto, mediante número de protocolo 2013/71.

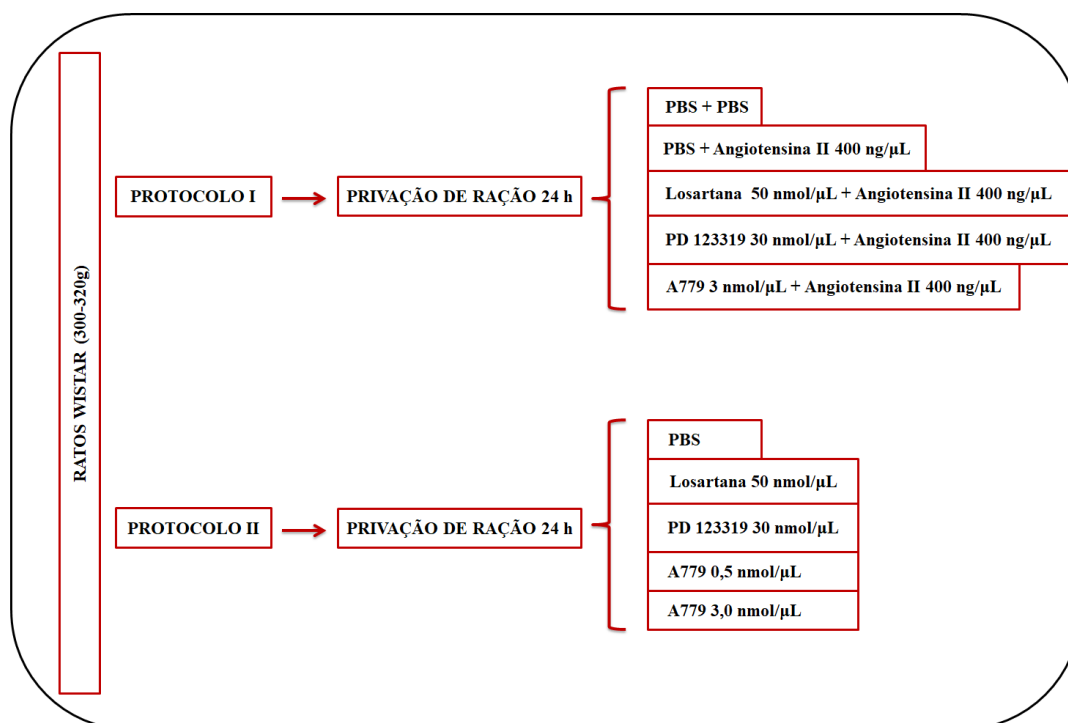


Figura 1: Protocolos experimentais com as respectivas substâncias e suas concentrações utilizadas nos experimentos.

III. ii VEÍCULO, SUBSTÂNCIAS E FÁRMACOS

i. VEÍCULO UTILIZADO PARA DILUIR AS SUBSTÂNCIAS MICROINJETADAS NO VL

- PBS (Salina tamponada com fosfato)

Solução preparada a partir da diluição dos sais de NaCl, Na₂HPO₄.H₂O e NaH₂PO₄.H₂O (Sigma-Aldrich SP, Brasil) em q.s.p. 1000 mL de água ultra purificada (Milli-Q), pH 7,2, esterilizada e mantida a temperatura ambiente em vidraria Mariotte.

ii. SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS NAS MICROINJEÇÕES INTRACEREBROVENTRICULARES (ICV)

- Angiotensina II (Sigma®)

Foi pesada, em seguida, diluída na concentração de 400 ng/μL, alicotada em 10 μL para tubos Eppendorf de 0,5 mL e armazenada a -5°C até o uso (DE MARCHI, 2014).

- Losartana potássica (Gemini®) (antagonista de receptores AT1 da ANG II)

Foi pesada, em seguida, diluída na concentração 50 nmol/μL, alicotada em 10 μL para tubos Eppendorf de 0,5 mL e armazenada a -5°C até o uso (DE MARCHI, 2014).

- PD 123319 (Sigma®) (antagonista de receptores AT2 da ANG II)

Foi pesado, em seguida, diluído na concentração 30 nmol/μL, alicotado em 10 μL para tubos Eppendorf de 0,5 mL e armazenado a -5°C até o uso (NAKANO-TATENO *et al.*, 2012)

- A779 (Doação do Prof. Robson Augusto Souza dos Santos, professor aposentando do departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG) (antagonista de receptores MAS da ANG (1-7)):

Foi pesado, em seguida, diluído nas concentrações de 0,5 nmol/μL e 3 nmol/μL, alicotados em 10 μL para tubos Eppendorf de 0,5 mL e armazenados a -5°C até o uso (SILVA *et al.*, 2014).

iii. FÁRMACOS UTILIZADOS NAS CIRURGIAS

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados com animais anestesiados, e após as cirurgias, esses animais receberam injeções de anti-inflamatório e antibiótico.

- Anestésico

Solução de cetamina-anestésico (Syntec, SP, Brasil) mais xilasina-relaxante muscular (Syntec, SP, Brasil). Para obter essa solução foi diluído 2,5 mL de xilasina 2% (p/v) em 10 mL de cetamina 10% (p/v). A dose empregada foi 80 mg/Kg de cetamina e 7 mg/kg de xilasina em um volume de 0,1 mL/100g de animal, por via intraperitoneal.

- Anti-inflamatório

Cetoprofeno 10% (Biofarm, SP, Brasil) que consistiu em 2 mg/kg em 0,1 mL por animal, via intramuscular.

- Antibiótico

Pentabiótico veterinário (Zoetis, SP, Brasil) que consistiu em 0,1 mL/300g de animal (Penicilina 4.800 UI/kg, Estreptomicina 2 mg/kg de diidroestreptomicina 2 mg/kg), por via subcutânea.

i.v FÁRMACOS UTILIZADOS NA EUTANÁSIA

- Anestésico

Tiopental sódico (Thiopentax®) (60 mg/kg – volume de injeção: 0,1 mL para cada 100 g de peso corporal do animal).

- Solução para perfusão

Formalina 10% tamponada com fosfato 0,1 M.

III. iii CONFECÇÃO DOS MATERIAIS UTILIZADOS NA ESTEREOTAXIA

- Cânulas Guia

As cânulas guia foram feitas utilizando agulhas hipodérmicas de canhão cinza (20×0,55 mm, diâmetro externo 0,55) cortadas e com comprimento ajustado em paquímetro (Universal®) para 10,0 mm.

- Agulhas Injetoras

As agulhas injetoras foram feitas a partir de agulhas gengivais (30G) de canhão amarelo, cortadas e com comprimento precisamente ajustado para 12,0 mm com o auxílio de uma cânula padrão também com 12,0 mm previamente ajustada com o auxílio do paquímetro (Universal[®]).

III. iv CIRURGIA ENCEFÁLICA (ESTEREOTAXIA)

A cirurgia consistiu no implante de cânula guia no encéfalo dos ratos, direcionada ao ventrículo lateral (VL) com auxílio de um aparelho estereotáxico (Stoelting[®]). Para isso, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de solução de cetamina (80 mg/kg) e xilasina (7 mg/kg). Em seguida, os ratos passaram por tricotomia e foram colocados no aparelho estereotáxico (Figura 2). A área tricotomizada passou por assepsia com álcool iodado 10% para início dos procedimentos cirúrgicos. Antes do início da cirurgia foi feita a verificação do estado anestésico do animal mediante o auxílio de uma pinça que foi pressionada no espaço interdigital da pata traseira do animal, confirmando a ausência de reflexo, para assim, proceder ao início da cirurgia. A parte superior da calota craniana foi exposta por meio de uma incisão mediana, paralela à sutura sagital. Foram introduzidos dois parafusos de aço inoxidável no crânio desses animais a partir de uma trepanação do osso do crânio com uma broca esférica, abrindo um orifício de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro a fim de, conferir estabilidade ao implante da cânula guia após o fim da cirurgia. As suturas do crânio, bregma e lambda (Figura 2) foram utilizadas como referência para nivelar as cabeças dos animais, modificando a posição da haste incisora. Utilizando-se o bregma foram determinados os pontos de inserção das cânulas de aço inoxidável na cabeça dos ratos. As cânulas de 10 mm x 0,5 mm d.i. foram orientadas de acordo com as seguintes coordenadas: 1,0 mm antero-posterior, 1,7 mm mediana à lateral direita e 3,7 mm dorso-ventricular (abaixo da dura-máter). O corte cirúrgico foi fechado com resina acrílica odontológica, fixando a cânula guia com o auxílio dos parafusos previamente implantados. Após a resina estar seca, a cânula guia foi ocluída com um mandril de aço inoxidável até o momento dos experimentos. Após a estereotaxia, os ratos receberam uma injeção de anti-inflamatório cetoprofeno 2 mg/Kg por via intramuscular e Pentabiótico Veterinário 0,1 mL/300g de animal por via subcutânea. Os animais permaneceram em recuperação e mediante cuidados pós-operatórios em suas

gaiolas individuais por, pelo menos 5 dias, com livre acesso a ração e água, antes de serem iniciados os experimentos.

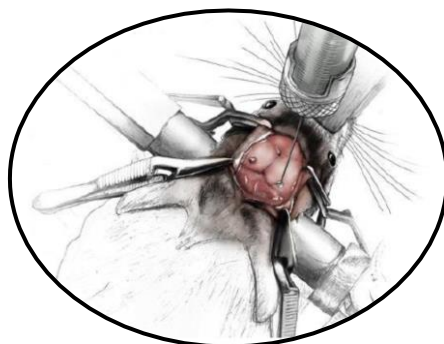


Figura 2: Suturas do osso do crânio utilizadas na cirurgia estereotáxica. (Fonte: Gomes, 2015).

III. v MICROINJEÇÕES DE SUBSTÂNCIAS NO VENTRÍCULO LATERAL (VL)

As microinjeções intracerebroventriculares descritas nos protocolos experimentais aconteceram com o auxílio de uma seringa Hamilton (10 μ L) conectada com um tubo de polietileno PE-10 de aproximadamente 20,0 cm a uma agulha injetora de 12,0 mm, introduzida no encéfalo por meio da cânula guia de 10,0 mm, implantada pela cirurgia estereotáxica. Para isso, o animal foi contido e realizada a retirada do mandril e a introdução da agulha injetora, sendo microinjetado o volume de 1 μ L por aplicação, seguindo os protocolos experimentais. Após a microinjeção, a agulha injetora foi retirada e o mandril foi novamente colocado para evitar a oclusão da cânula guia.

III. vi PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Após aguardar, no mínimo, 5 dias (Figura 3) após a realização das cirurgias encefálicas (para recuperação dos animais), os animais foram submetidos aos seguintes protocolos experimentais:

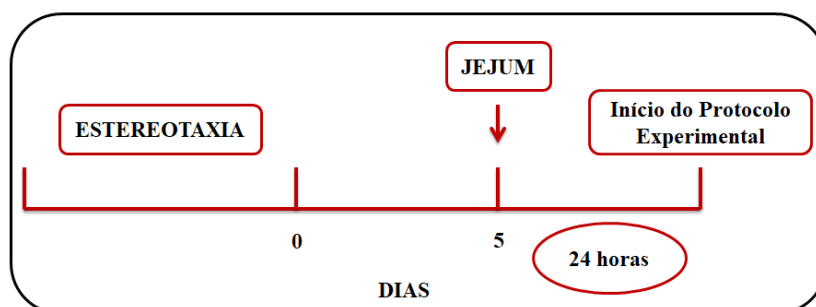


Figura 3: Esquema representando o momento da cirurgia (estereotaxia) até o dia do primeiro jejum, aguardando no mínimo 5 dias do pós-cirúrgico e as 24 h de jejum que antecedem o início do experimento.

Protocolo I- Estudo da interação dos receptores AT1, AT2 e MAS com ANG II na ingestão de alimentos em ratos privados de alimento por 24 h.

A ingestão de alimento foi induzida pelo protocolo de privação de alimento por 24 h, sendo que ração, mas não água, foi retirada dos animais. Trinta minutos antes das 24 h, os animais receberam microinjeções centrais (VL) de um dos antagonistas da ANG II (Losartana, PD 123319) ou da ANG (1-7) (A779) ou PBS (veículo) e após 15 minutos foi realizada a microinjeção central de ANG II ou PBS. Quinze minutos após a última microinjeção central, ração e água foram oferecidas ao animal, e foram feitas as medidas de ingestão nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos. Ao final dos 120 minutos, os animais tiveram livre acesso a ração e água. No dia do experimento o grupo de ratos foi dividido em dois e cada metade do grupo recebeu um dos tratamentos. A sequência de tratamentos foi aleatória, e no final, todos os animais receberam todos os 5 tratamentos: PBS + PBS; PBS + ANG II; Losartana + ANG II; PD + ANG II e A779 + ANG II. Foi guardado sempre um intervalo de 48 h, entre um experimento e outro.

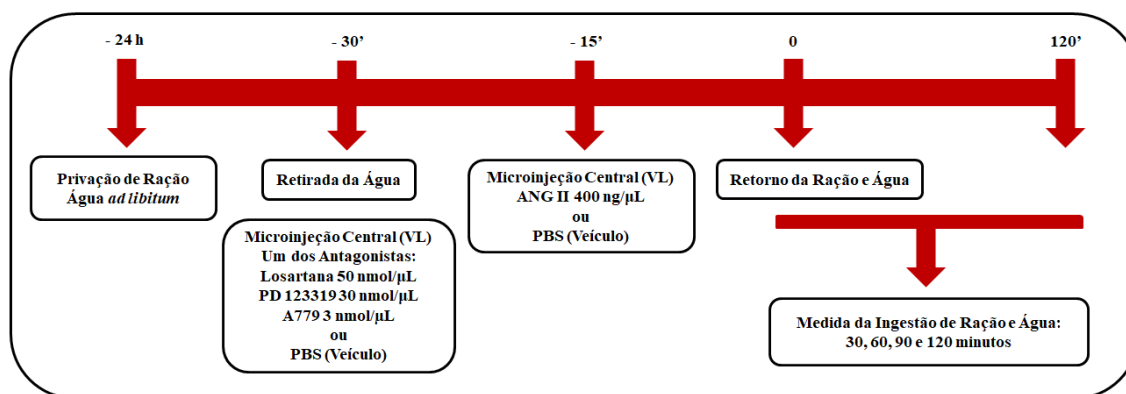


Figura 4: Delineamento do Protocolo Experimental para estudo da interação entre os receptores AT1 e AT2 da ANG II com os receptores MAS das ANG (1-7).

Protocolo II- Estudo do bloqueio dos receptores AT1 e AT2 da ANG II, MAS da ANG (1-7) na ingestão de alimento em ratos privados de alimento por 24 h

A ingestão de alimento foi induzida pelo protocolo de privação de alimento por 24 h, sendo que ração, mas não água, foi retirada dos animais. Quinze minutos antes das 24 h, os animais receberam microinjeção central de um dos antagonistas da ANG II (Losartana, PD 123319), ANG (1-7) (A779) ou PBS (veículo). Quinze minutos depois ração e água foram oferecidas ao animal, e foram feitas as medidas de ingestão nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos. Ao final dos 120 minutos, os animais tiveram livre acesso a ração e água. No dia do experimento o grupo de ratos foi dividido em dois e cada metade do grupo recebeu um dos tratamentos, PBS ou antagonista. Foi guardado sempre um intervalo de 48 h, entre um experimento e outro.

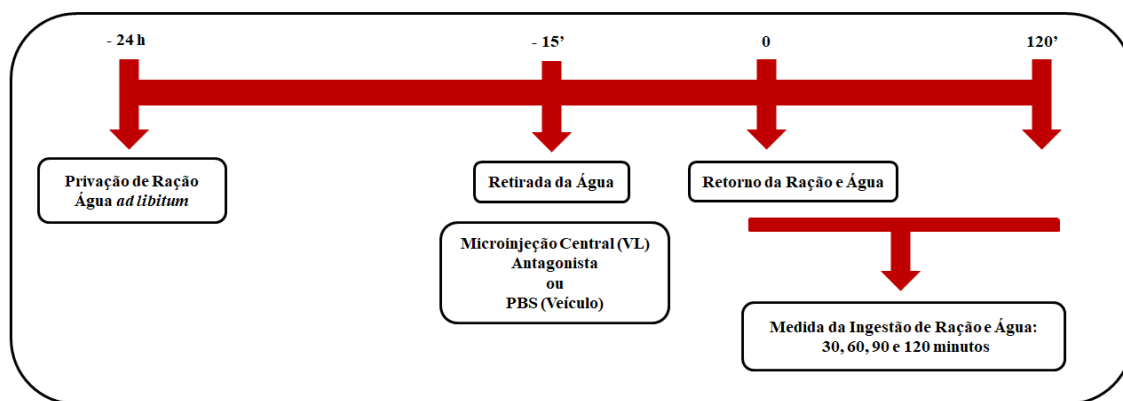


Figura 5: Delineamento do Protocolo Experimental para estudo do bloqueio dos receptores AT1 (Losartana: 50 nmol/1 μ L) e AT2 (PD 123319: 30 nmol/1 μ L) da ANG II, MAS (A779: 0,5 e 3 nmol/1 μ L) da ANG (1-7).

III. vii ANÁLISE HISTOLÓGICA – CONFIRMAÇÃO DO SÍTIO DE MICROINJEÇÃO NO VL

Ao término dos experimentos, o sítio de injeção na qual as substâncias foram microinjetadas foi marcado com a microinjeção de 1 μ L de azul de Evans. Os ratos foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (60 mg/kg – volume de injeção: 0,1 mL para cada 100 g de peso corporal) intraperitonealmente. Foi feita também uma abertura torácica para a exposição do coração, que então foi perfundido com 20 mL de formalina 10% tamponada com fosfato 0,1 M. Em seguida, realizou-se uma craniotomia, o encéfalo foi removido e fixado em formalina 10% tamponada com

fosfato 0,1 M por, no mínimo, 24 horas. Após esse período, secções coronais (50 µm de espessura) foram feitas nos sítios de injeção por meio do criostato e em seguida montadas sobre lâminas de vidro previamente gelatinizadas. Os cortes foram, então, visualizados a fresco sob lupa (aumento aproximado de 5 vezes) para confirmação da microinjeção no ventrículo lateral. Apenas animais cuja cânula cirúrgica estava no VL foram considerados na análise dos dados.

III. viii APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram tabelados. A média e o erro padrão da média foram representados em gráficos utilizando o software GraphPad Prism 8.0 for Windows. Análise de variância (ANOVA) de duas vias e o Fisher's LSD como pós-teste foram utilizados para as comparações entre os diferentes tratamentos em diferentes tempos, diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

IV. i ANÁLISE HISTOLÓGICA

A Figura 6 mostra um corte coronal do encéfalo de um rato indicando a trajetória da cânula guia (T) e o ventrículo lateral (VL), onde foram realizadas as microinjeções.

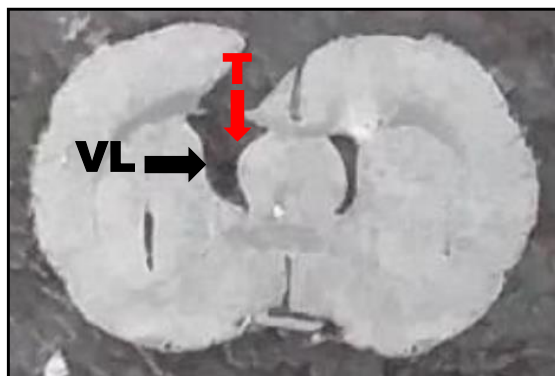


Figura 6: Foto de um corte histológico do encéfalo de um rato mostrando a trajetória (T) da cânula guia (seta vermelha) e a (seta preta) o ventrículo lateral (VL).

IV. ii INTERAÇÃO DOS RECEPTORES AT1, AT2 E MAS COM ANG II NA INGESTÃO DE ALIMENTOS EM RATOS PRIVADOS DE ALIMENTO POR 24 H

i. INGESTÃO DE ALIMENTO APÓS INJEÇÃO ICV DOS ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES AT1, AT2 E MAS ASSOCIADOS À ANG II

Como esperado, a injeção central ANG II foi capaz de reduzir a ingestão acumulativa de alimento induzida por privação nos primeiros 30 minutos (PBS + ANG II 400 ng/ μ L: $2,6 \pm 0,3$ vs PBS + PBS: $4,0 \pm 0,1$ g/ 30 min, Figura 7A e 7E). A prévia injeção dos antagonistas da ANG II, Losartana (antagonista de receptor AT1, Figura 7B e 7E) e PD 1223319 (antagonista de receptor AT2, Figura 7C e 7E) aboliram o efeito hipofágico causado pela ANG II e ainda a associação (antagonista + ANG II) levou a um aumento da ingestão de alimento quando comparado ao grupo controle (PBS) (LOS + ANG II: $7,7 \pm 0,5$ vs PBS + PBS: $5,6 \pm 0,5$ g/ 120 min.; PD + ANG II: $7,9 \pm 0,4$ vs PBS + PBS: $5,6 \pm 0,5$ g/ 120 min.). O bloqueio dos receptores MAS da ANG (1-7) (A779) não afetou o efeito hipofágico da ANG II (Figuras 7D e 7E).

O mesmo foi observado quando a ingestão foi analisada por intervalos (ingestão não acumulativa), sendo que ANG II foi capaz de inibir a ingestão de alimento induzida por privação no período de 0 a 30 min (Figura 8A e 8E), e a prévia injeção de Losartana (Figuras 8B e 8E) e PD 123319 (Figuras 8C e 8E) aboliram este efeito hipofágico da ANG II (intervalo de 0 a 30 min) e levaram a um aumento da ingestão de alimento no intervalo de 60 a 90 min. (LOS + ANG II: $1,4 \pm 0,4$; PD + ANG II: $1,3 \pm 0,3$ vs PBS + PBS: $0,1 \pm 0,1$ g/ 60-90 min.). A microinjeção de A779, antagonista do receptor MAS da ANG (1-7), como observado para a ingestão acumulativa, não afetou a ação hipofágica da ANG II (Figuras 8D e 8E).

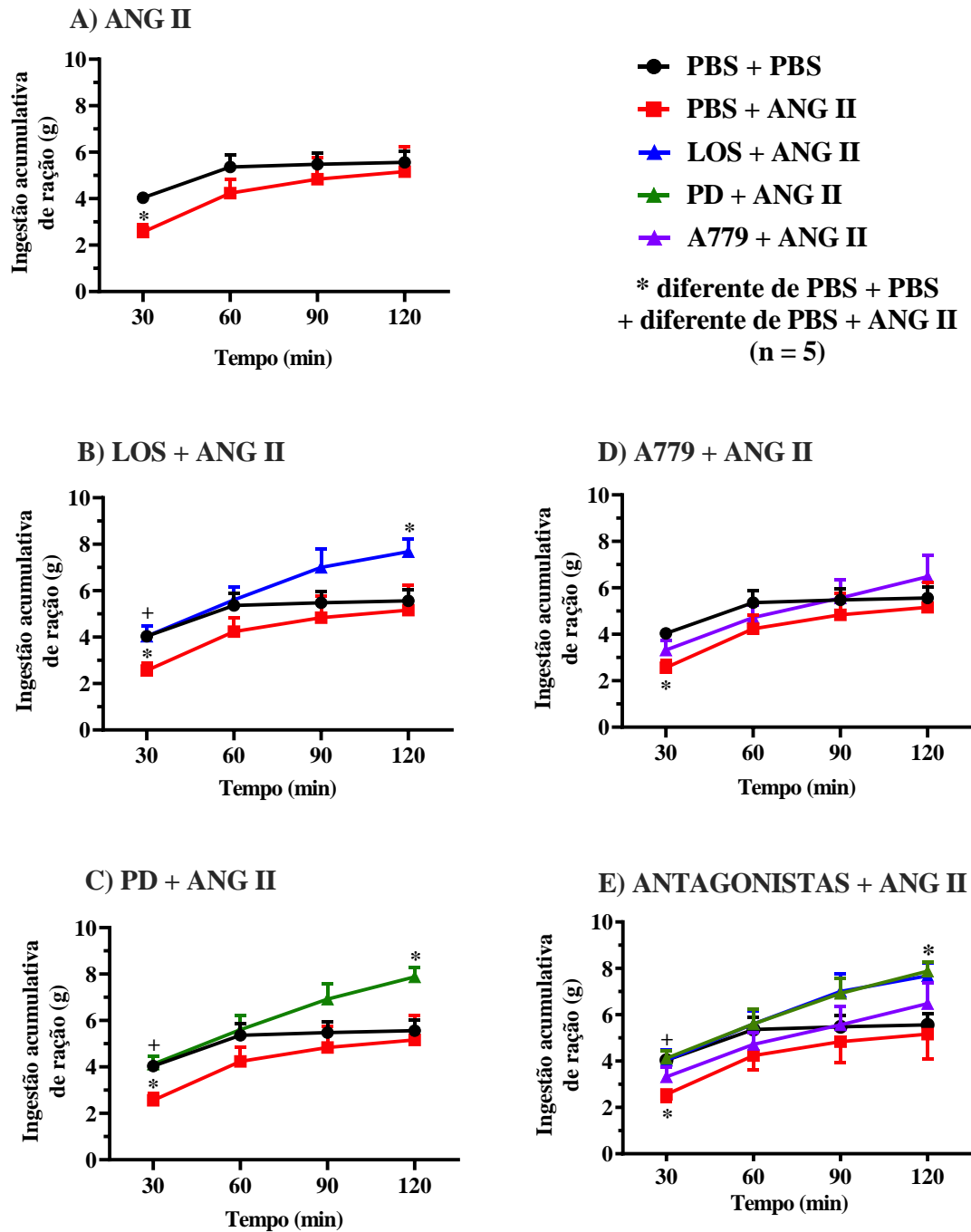


Figura 7: Ingestão acumulativa de ração (g) após injeção intracerebroventricular (icv) de PBS (A e E) ou dos antagonistas de receptores AT1 (LOS: 50 nmol/ μ L, B e E), AT2 (PD: 30 nmol/ μ L, C e E) e MAS (A779: 3,0 nmol/ μ L, D e E) + ANG II (400 ng/ μ L) em ratos 24 h privados de alimento. As medidas de ingestão foram feitas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. n = número de animais; LOS = Losartana; PD = PD 123319.

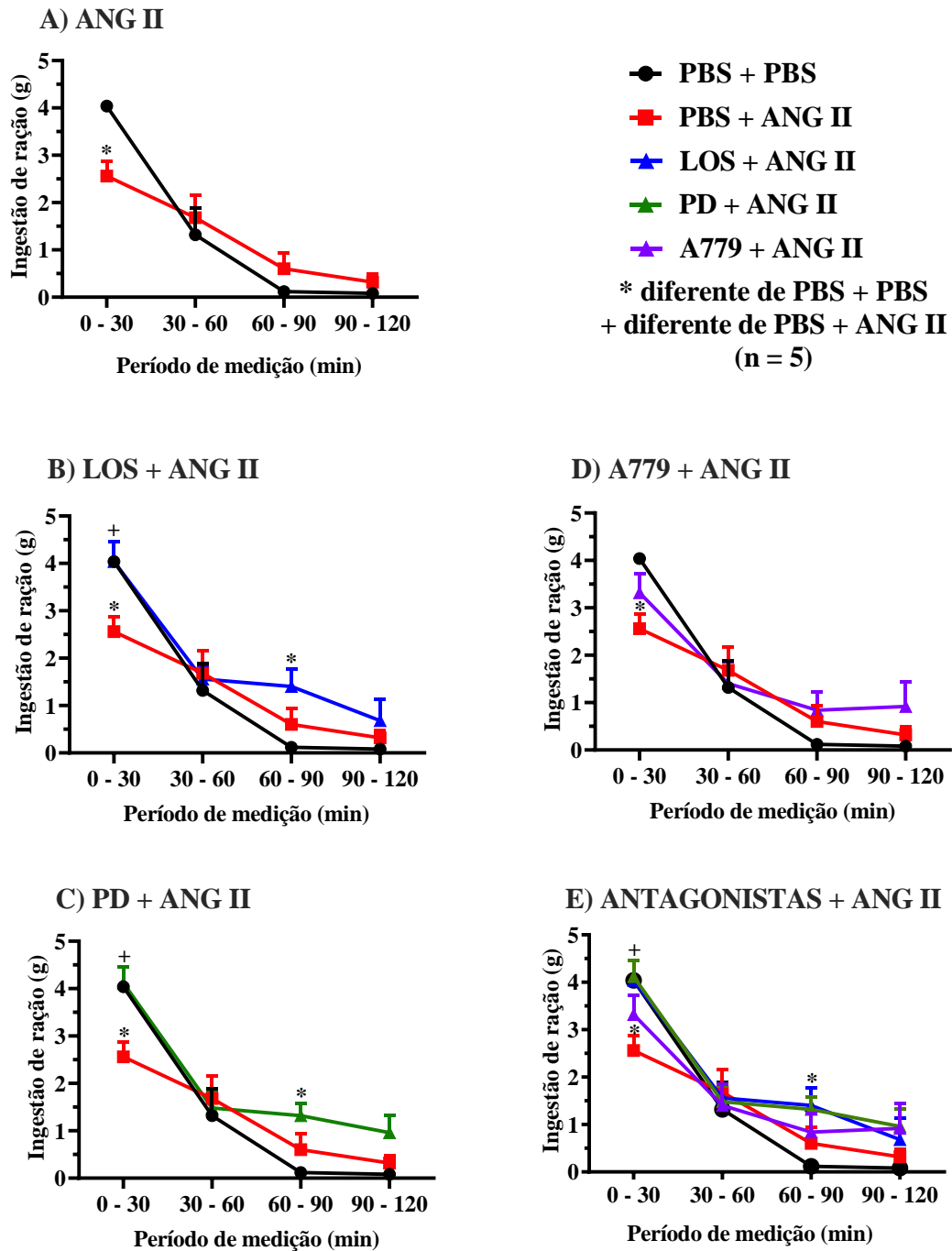


Figura 8: Ingestão de ração (g) por períodos após injeção intracerebroventricular (icv) de PBS (A e E) ou dos antagonistas de receptores AT1 (LOS: 50 nmol/ μ L, B e E), AT2 (PD: 30 nmol/ μ L, C e E) e MAS (A779: 3,0 nmol/ μ L, D e E) + ANG II (400 ng/ μ L) em ratos 24 h privados de alimento. As medidas de ingestão foram feitas nos intervalos de 0-30, 30-60, 60-90 e 90-120 minutos. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. n = número de animais; LOS = Losartana; PD = PD 123319.

ii. INGESTÃO DE ÁGUA APÓS INJEÇÃO ICV DOS ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES AT1, AT2 E MAS ASSOCIADOS À ANG II

Como esperado, provavelmente devido a sua ação dipsogênica, a ANG II potencializou a ingestão de água associada à ingestão de alimento tanto analisada de forma acumulativa (Figuras 9A e 9E) como por períodos (Figuras 10A e 10E, no intervalo de 0 – 30 min). Este efeito foi abolido pelo pré tratamento com o antagonista do receptor AT1 (LOS, Figuras 9B, 9E, 10B e 10E) e AT2 (PD 123319, Figuras 9C, 9E, 10 C e 10E) da ANG II, mas não foi afetado pelo antagonista do receptor MAS da ANG (1-7) (Figuras 9D, 9E, 10D e 10E).

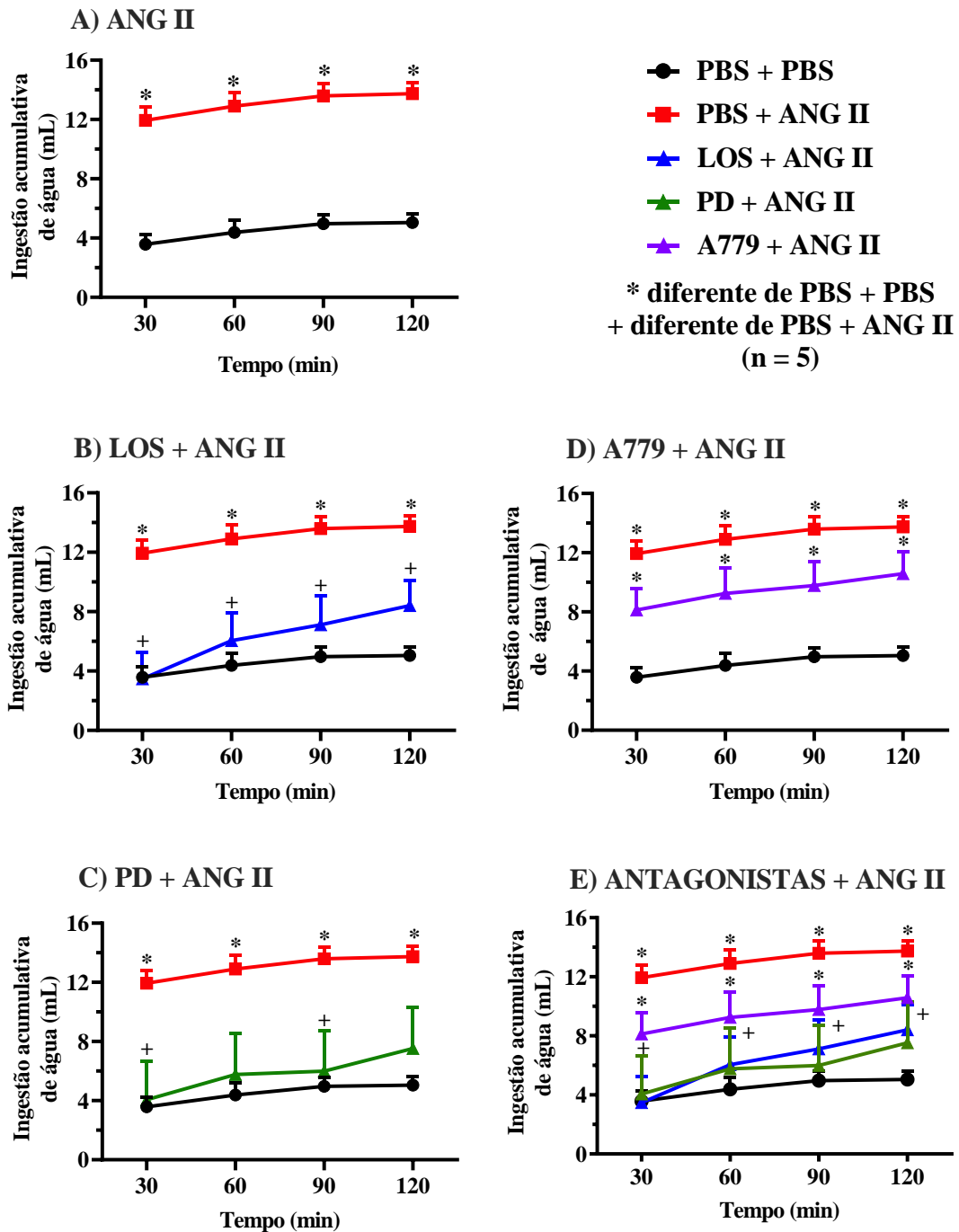


Figura 9: Ingestão acumulativa de água (mL) após injeção intracerebroventricular (icv) de PBS (A e E) ou dos antagonistas de receptores AT1 (LOS: 50 nmol/ μ L, B e E), AT2 (PD: 30 nmol/ μ L, C e E) e MAS (A779: 3,0 nmol/ μ L, D e E) + ANG II (400 ng/ μ L) em ratos 24 h privados de alimento. As medidas de ingestão foram feitas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. n = número de animais; LOS = Losartana; PD = PD 123319.

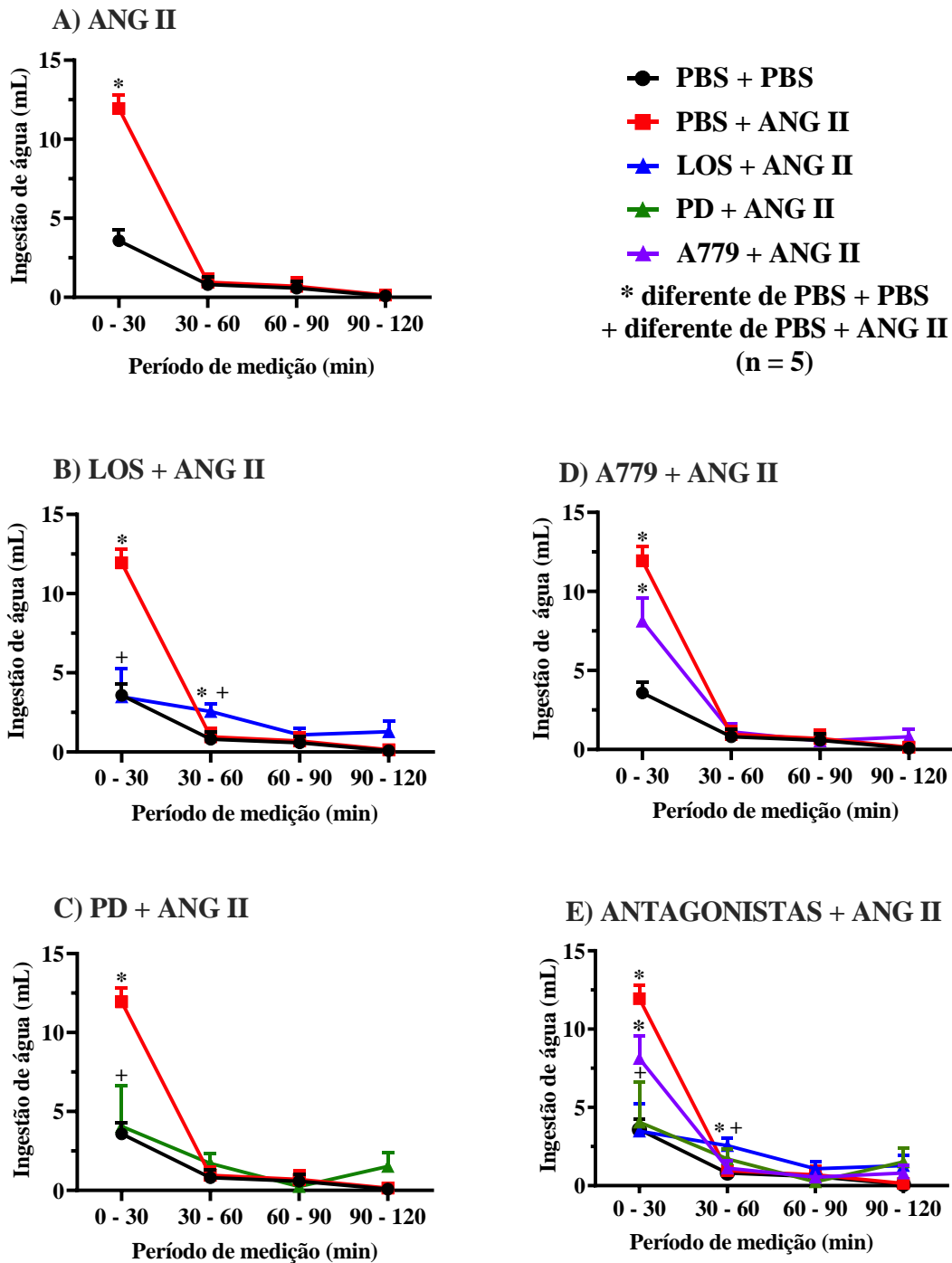


Figura 10: Ingestão de água (mL) por períodos após injeção intracerebroventricular (icv) de PBS (A e E) ou dos antagonistas de receptores AT1 (LOS: 50 nmol/ μ L, B e E), AT2 (PD: 30 nmol/ μ L, C e E) e MAS (A779: 3,0 nmol/ μ L, D e E) + ANG II (400 ng/ μ L) em ratos 24 h privados de alimento. As medidas de ingestão foram feitas nos intervalos de 0-30, 30-60, 60-90 e 90-120 minutos. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. n = número de animais; LOS = Losartana; PD = PD 123319.

IV. iii BLOQUEIO DOS RECEPTORES AT1 E AT2 DA ANG II, MAS DA ANG (1-7) NA INGESTÃO DE ALIMENTO EM RATOS PRIVADOS DE ALIMENTO POR 24 H

i. INGESTÃO DE ALIMENTO E ÁGUA APÓS INJEÇÃO ICV DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR AT1 DA ANG II

A administração icv do antagonista de receptores AT1, Losartana, (LOS: 50 nmol/ μ L) não afetou a ingestão nem de ração (Figuras 11A e 11B), nem a de água (Figuras 11C e 11D) em ratos submetidos à 24 h de privação de alimento.

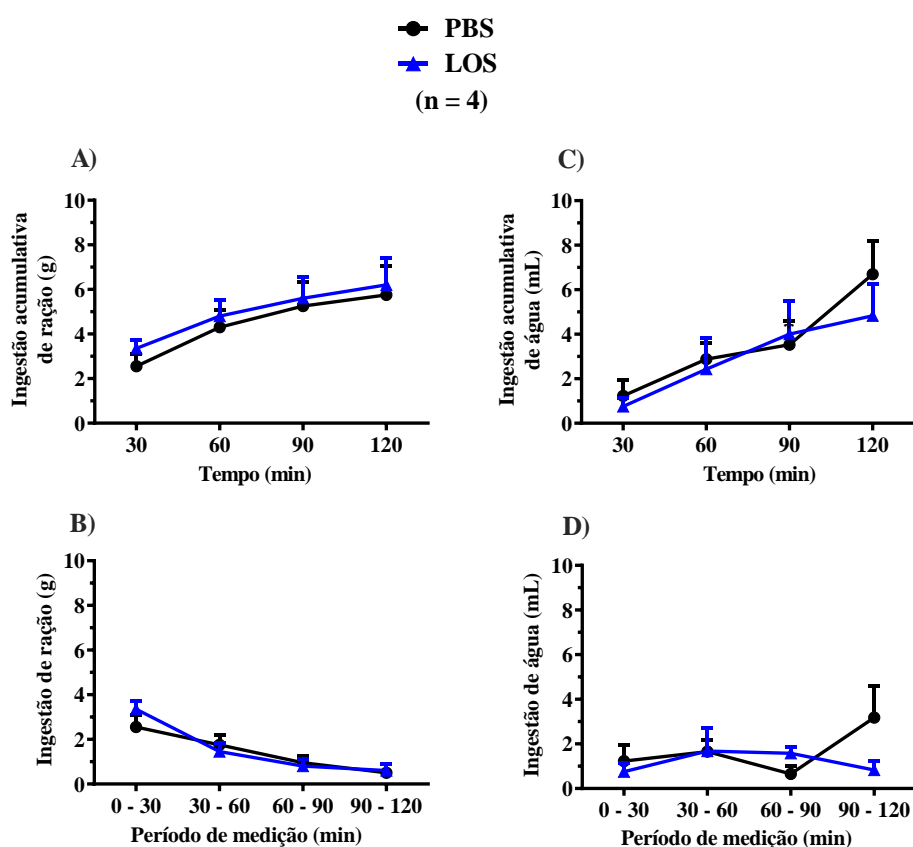


Figura 11: Ingestão acumulativa (A e C) e por períodos (B e D) de ração (g) e água (mL), respectivamente, após injeção intracerebroventricular (icv) de PBS ou do antagonista de receptores AT1 (LOS: 50 nmol/ μ L) em ratos 24 h privados de alimento. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. n = número de animais. LOS = Losartana.

ii. INGESTÃO DE ALIMENTO E ÁGUA APÓS INJEÇÃO ICV DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR AT2 DA ANG II

Em ratos previamente submetidos à privação de alimento, tanto a ingestão de ração (Figuras 12A e 12B) quanto à ingestão de água (Figuras 12C e 12D), não foram afetadas pelo bloqueio dos receptores AT2 (PD: 30 nmol/ μ L) da ANG II.

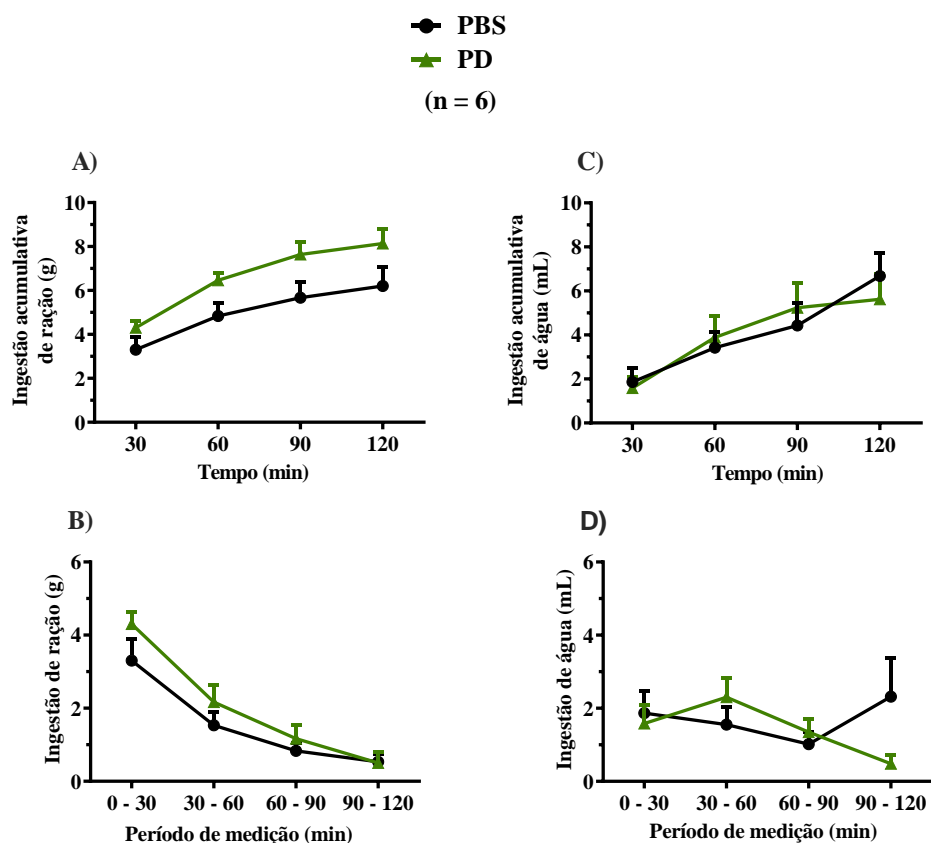


Figura 12: Ingestão acumulativa (A e C) e por períodos (B e D) de ração (g) e água (mL), respectivamente, após injeção intracerebroventricular (icv) de PBS ou do antagonista de receptores AT2 (PD: 30 nmol/ μ L) em ratos 24 h privados de alimento. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. n = número de animais. PD = PD 123319.

iii. INGESTÃO DE ALIMENTO E ÁGUA APÓS INJEÇÃO ICV DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR MAS DA ANG (1-7)

Diferentemente dos antagonistas da ANG II, o antagonista dos receptores MAS da ANG (1-7) (A779: 3 nmol/ μ L) foi capaz de aumentar a ingestão de alimento (Figura 13A e 13B) induzida por privação de ração, assim como a ingestão de água associada (Figura 13C e 13D). Ao analisar por períodos foi possível verificar que o aumento da ingestão de alimento ocorreu no intervalo de 30 a 60 min (Figura 13B), enquanto o aumento da ingestão de água foi no intervalo subsequente, de 60 a 90 min (Figura 13D).

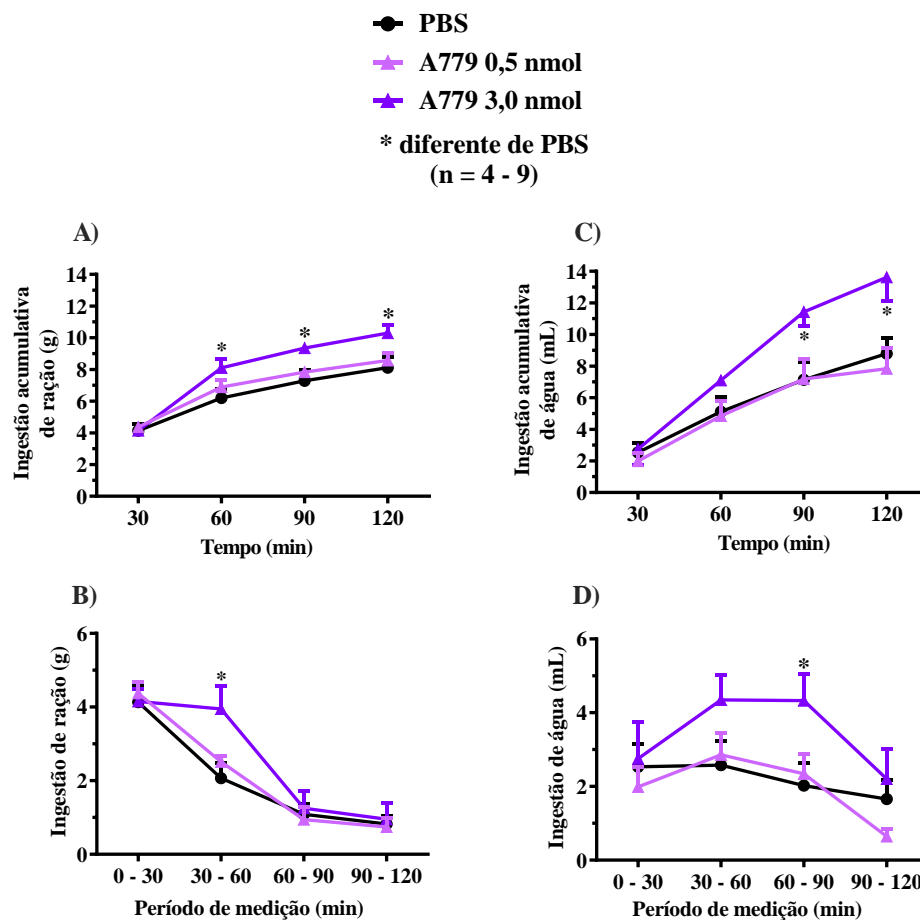


Figura 13: Ingestão acumulativa (A e C) e por períodos (B e D) de ração (g) e água (mL), respectivamente, após injeção intracerebroventricular (icv) de PBS ou do antagonista de receptores MAS (A779: 0,5 e 3 nmol/ μ L) em ratos 24 h privados de alimento. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

V. DISCUSSÃO

Os resultados mostraram tanto um efeito hipofágico quanto dipsogênico da angiotensina II (400 ng/ μ L, microinjetada no VL) em ratos previamente privados de alimento, sendo que estes efeitos foram dependentes tanto dos receptores AT1 quanto AT2 da ANG II, sem participação aparente dos receptores MAS da angiotensina (1-7). Ademais, o estudo apenas com os antagonistas, mostrou que o bloqueio dos receptores MAS, mas não do AT1 ou AT2, aumentou tanto a ingestão de alimento induzida por privação, quanto à ingestão de água associada.

Esses resultados vão de encontro com os dados da literatura, afinal a ANG II é conhecida por promover um efeito dipsogênico, além do fato de que estudos mostraram que a ANG II central reduziu tanto a ingestão de alimento basal, quanto à induzida por privação (FITZSIMONS, 1998; PÖRTER *et al.*, 2003; PÖRTER & POTRATZ, 2004; NAKANO-TATENO *et al.*, 2012; YOSHIDA *et al.*, 2012; DE MARCHI, 2014). Assim, pode-se observar que em ambas as situações (basal ou induzida), a ANG II central apresentou um efeito hipofágico.

O efeito hipofágico da ANG II foi observado logo no primeiro período de ingestão (0-30 min.), juntamente com o aumento da ingestão de água. Sabendo do potente efeito dipsogênico da ANG II, seria razoável considerar a hipótese de que, a redução na ingestão de alimento poderia ser decorrente do aumento da ingestão de água promovida pela ANG II, uma vez que ou o animal está bebendo água ou ingerindo alimento. Contudo, de acordo com dados da literatura, animais com alimento e água *ad libitum* e animais nos quais apenas a água estava restrita, apresentaram resultados semelhantes, decorrentes da infusão central de ANG II, quanto à ingestão basal de alimento, gasto energético e perda de peso (PÖRTER & POTRATZ, 2004), sugerindo que o efeito hipofágico da ANG II seria independente do seu efeito dipsogênico. Ademais, em animais privados de alimento, quando foi ofertado apenas alimento, mas não água, a ANG II apresentou um efeito hipofágico, o qual perdurou até os 60 min ($4,0 \pm 0,5$ vs PBS: $5,6 \pm 0,4$ g/60 min, $p = 0,03$, dado não publicado). Portanto, o efeito hipofágico da ANG II não seria secundário ao seu efeito dipsogênico.

Ao observar os resultados dos antagonistas associados à ANG II, observou-se que o bloqueio dos receptores AT1 (com Losartana) e AT2 (com PD 123319) aboliram os efeitos da ANG II, tanto em relação a redução da ingestão de alimento quanto ao

aumento da ingestão de água, sugerindo que ambos efeitos da ANG II dependem da ativação dos receptores AT1 e AT2.

Em relação à ingestão de alimento, tanto o antagonista AT1 quanto o AT2, além de abolirem inicialmente, foram capazes de reverter o efeito inibitório da ANG II, sendo que aproximadamente na segunda metade do teste de ingestão, os animais ingeriram mais ração do que o grupo controle. Poderia ser possível, que com o decorrer do tempo do experimento, estes antagonistas passassem a inibir a ANG II endógena, levando assim, a um aumento na ingestão de alimento. Todavia, quando administrados sozinhos, nem Losartana nem PD 123319, foram capazes de alterar a ingestão de alimento induzida, sugerindo que a ANG II endógena não teria um papel importante em regular a ingestão de alimento induzida. Mais estudos se fazem necessários para se compreender o aumento da ingestão de alimento decorrente da associação do antagonista AT1 ou AT2 e a ANG II.

O envolvimento dos receptores AT1 e AT2 no controle da ingestão alimentar tem sido estudado. Animais knockout para receptores AT1 apresentaram hiperfagia e uma atenuação do efeito inibitório central da ANG II na ingestão alimentar (OHINATA *et al.*, 2008; YAMAMOTO *et al.*, 2011). Com relação aos receptores AT2, estudos de YOSHIKAWA *et al* (2012) evidenciaram que a microinjeção icv de um agonista AT2 exerce um efeito hipofágico e ainda OHINATA (2008) demonstrou que em animais knockout para receptores AT2 não foi observado o efeito hipofágico da ANG II. Ademais, numa situação basal, o tratamento com o antagonista do receptor AT2 (PD 123319) aboliu o efeito inibitório central da ANG II sobre a ingestão de alimento (NAKANO-TATENO, 2012). Portanto, considerando a literatura, estes dados corroboram com parte dos dados desse estudo, no qual o bloqueio do receptor AT1 ou AT2 associado à ANG II poderia aumentar a ingestão de alimento, mas não com os dados no qual apenas Losartana ou PD 123319 não foram capazes de alterar a ingestão de alimento. Uma possibilidade seria que estes estudos da literatura se referem à ingestão basal, enquanto, o presente trabalho envolve uma situação de ingestão induzida por privação, o que poderia levar a ativação de outros mecanismos para o controle da ingestão.

Em relação à ingestão de água, já é sabido que o bloqueio dos receptores AT1 leva a uma redução da ingestão de água em animais privados de água ou após injeção

icv de solução hipertônica de NaCl (BLAIR-WEST *et al.*, 1994; FINDLAY, 1996; FITZSIMONS, 1980; SAAD & CAMARGO, 2003; WEISINGER *et al.*, 1996). Ademais, NAKANO-TATENO *et al* (2012) mostraram que o tratamento com o antagonista do receptor AT2 (PD 123319) aboliu o efeito facilitatório da ANG II sobre a ingestão de água que acompanha a ingestão de alimento. Estes dados colaboram com os resultados apresentados, no qual o bloqueio dos receptores AT1 e AT2 aboliram o efeito facilitatório da ANG II na ingestão de água associada à ingestão de alimento. Ao se alimentar, há um aumento da osmolaridade plasmática que acaba induzindo a ingestão de água. Curiosamente, embora seja sabido o importante papel da ANG II na regulação da ingestão de água, aparentemente a ANG II endógena, não estaria envolvida na ingestão de água associada à ingestão de alimento, uma vez que, os antagonistas sozinhos não foram capazes de reduzir esta ingestão.

Outro peptídeo comumente estudado além da ANG II é a ANG (1-7) devido a sua função de contrabalancear várias ações fisiológicas da ANG II (SANTOS *et al.*, 1994; SILVA *et al.*, 1988). Em relação às ingestões de água e sódio, comportamentos ingestivos, a ANG (1-7), diferentemente da ANG II, não estimula a sede e nem o apetite ao sódio (MAHON *et al.*, 1995) numa situação basal, porém foi capaz de aumentar a ingestão de água induzida por privação hídrica ou sobrecarga de sal (Dos Santos *et al.*, 2017). Em relação à ingestão alimentar, de acordo com DE MARCHI (2014), em ratos previamente privados de alimento por 24 h, tanto ANG II quanto ANG (1-7), ambas na concentração de 400 ng/ μ L, reduziram a ingestão de alimento, ao passo que, a ANG II estimulou a ingestão de água associada à ingestão de alimento e a ANG (1-7) reduziu esse comportamento. Seria possível que esta ingestão de água associada à ingestão de alimento reduzida pela ANG (1-7) seja uma consequência do efeito hipofágico apresentado por ela. De forma geral, é possível hipotetizar que as vias/circuitos neurais ativados ou inibidos por esses peptídeos sejam semelhantes quando o intuito é restringir a ingestão de alimento, mas sejam diferentes quando o objetivo é a ingestão de água associada à ingestão de alimento.

Segundo os resultados obtidos neste trabalho, o A779 não foi capaz de afetar o efeito hipofágico ou facilitatório para a ingestão de água da ANG II, sugerindo que a ativação de mecanismos envolvendo a ANG (1-7) não estariam envolvidos nestes efeitos da ANG II. Todavia, apenas o bloqueio do receptor MAS da ANG (1-7) pelo A779 (3 nmol) aumentou a ingestão de alimento e de água associada à ingestão de

alimento em ratos privados, sugerindo que diferentemente da ANG II, a ANG (1-7) endógena teria uma papel inibitório na ingestão de alimento induzida, e conseqüentemente, na ingestão de água associada à ingestão de alimento. Isto está de acordo com DE MARCHI (2014) que mostrou que a ANG (1-7) central reduziu a ingestão de alimento induzida e da ingestão de água associada à ingestão de alimento. Portanto, se a ANG (1-7) participasse dos mecanismos inibitórios envolvidos na ingestão induzida por privação de alimento, seria viável que, com o bloqueio de seus receptores, houvesse uma resposta inversa, ou seja, potencialização da ingestão de alimento.

Em síntese, os resultados mostraram que o efeito hipofágico da ANG II central envolve os receptores AT1 e AT2, mas não a participação de mecanismos envolvendo a ANG (1-7). Além disso, observou-se um possível envolvimento da ANG (1-7) endógena no controle da ingestão de alimento.

VI. CONCLUSÃO

ANG II, atuando em áreas periventriculares prosencefálicas, via receptores AT1 e AT2, reduz a ingestão de alimento e induz a ingestão de água. Além da ANG II, a ANG (1-7) endógena, via receptor MAS, parece também ter um efeito hipofágico.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIZAID, Alfonso; HORVATH, Tamas L. Brain circuits regulating energy homeostasis. *Regulatory peptides*, v. 149, n. 1-3, p. 3-10, 2008.

AIRES, Margarida de Mello. Seção 7 Fisiologia Renal; Rim e Hormônios; Sistema Renina-Angiotensina 4ª edição. Livro texto de Fisiologia. Editora: Guanabara Koogan, 2012, 55: 786-789.

ANDRADE, João Marcus Oliveira et al. Proteomic white adipose tissue analysis of obese mice fed with a high-fat diet and treated with oral angiotensin-(1-7). *Peptides*, v. 60, p. 56-62, 2014.

BLAIR-WEST, John R. et al. Thirst induced by increasing brain sodium concentration is mediated by brain angiotensin. *Brain research*, v. 637, n. 1-2, p. 335-338, 1994.

BROBERGER, Christian et al. 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*, v. 95, n. 25, p. 15043-15048, 1998.

BROSNIHAN, K. Bridget; LI, Ping; FERRARIO, Carlos M. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension*, v. 27, n. 3, p. 523-528, 1996.

CAMPAGNOLE-SANTOS, MARIA J. et al. Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 263, n. 1, p. R89-R94, 1992.

CAMPBELL, Duncan J. et al. Evidence against a major role for angiotensin converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) in angiotensin peptide metabolism in the human coronary circulation. *Journal of hypertension*, v. 22, n. 10, p. 1971-1976, 2004.

CHAPPELL, Mark C. et al. Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension*, v. 31, n. 1, p. 362-367, 1998.

CONE, R. D. et al. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *International Journal of Obesity*, v. 25, n. 5, p. S63-S67, 2001.

CORDEIRA, Joshua W. et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates hedonic feeding by acting on the mesolimbic dopamine system. *Journal of neuroscience*, v. 30, n. 7, p. 2533-2541, 2010.

DE MARCHI P.M. Angiotensina II e Angiotensina 1-7: Ação anoréxica central em ratos privados de alimento. Dissertação (Mestrado em Saúde e Nutrição) –Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2014.

DONOGHUE, Mary et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation research*, v. 87, n. 5, p. e1-e9, 2000.

DOS-SANTOS, Raoni Conceição et al. Central angiotensin-(1–7) increases osmotic thirst. *Experimental physiology*, v. 102, n. 11, p. 1397-1404, 2017.

E SILVA, Ana C. Simoes et al. Diuresis and natriuresis produced by long term administration of a selective angiotensin-(1–7) antagonist in normotensive and hypertensive rats. *Regulatory peptides*, v. 74, n. 2-3, p. 177-184, 1998.

FINDLAY, Alan LR. 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. *Regulatory peptides*, v. 66, n. 1-2, p. 95-100, 1996.

FITZSIMONS, James T. Angiotensin stimulation of the central nervous system. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Volume 87, p. 117-167, 1980.

FITZSIMONS, James T. The role of angiotensin II in the control of hypovolaemic thirst and sodium appetite. *Kidney and Body Fluids*, p. 555-562, 1981.

FITZSIMONS, J. T. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiological reviews*, v. 78, n. 3, p. 583-686, 1998.

FONTES, M. A. P. et al. Evidence that angiotensin-(1–7) plays a role in the central control of blood pressure at the ventro-lateral medulla acting through specific receptors. *Brain research*, v. 665, n. 1, p. 175-180, 1994.

FOUNTAIN JH, LAPPIN SL. Physiology, Renin Angiotensin System. [Updated 2021 Jul 22]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470410/>

GIANI, Jorge F. et al. Chronic infusion of angiotensin-(1–7) improves insulin resistance and hypertension induced by a high-fructose diet in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 296, n. 2, p. E262-E271, 2009.

GUYTON A.C, HALL J.E. Unit XIII Metabolism and temperature regulation: Dietary Balances; Regulation of Feeding; Obesity and Starvation; Vitamins and Minerals. 11 edition. *Textbook of medical Physiology*. Editora: Elsevier, 2006, 71: 867-872.

GOMES, Paula Magalhães. Mecanismos da hipertensão induzida por sobrecarga de sódio na dieta. 2015.

HARROLD, Joanne A. et al. CNS regulation of appetite. *Neuropharmacology*, v. 63, n. 1, p. 3-17, 2012.

HEITSCH, Holger et al. Angiotensin-(1-7)–stimulated nitric oxide and superoxide release from endothelial cells. *Hypertension*, v. 37, n. 1, p. 72-76, 2001.

KOSTENIS, Evi et al. G-protein–coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation*, v. 111, n. 14, p. 1806-1813, 2005.

LEIBOWITZ, SARAH F. Central physiological determinants of eating behavior and body weight. *Eating disorders and obesity: A comprehensive handbook*, p. 5-10, 2002.

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

MACGREGOR, Duncan P. et al. Angiotensin II receptor subtypes in the human central nervous system. *Brain research*, v. 675, n. 1-2, p. 231-240, 1995.

MACHADO, Rosângela DP; SANTOS, Robson AS; ANDRADE, Silvia P. Opposing actions of angiotensins on angiogenesis. *Life sciences*, v. 66, n. 1, p. 67-76, 1999.

MACHADO, R. D. P.; SANTOS, R. A. S.; ANDRADE, S. P. Mechanisms of angiotensin-(1–7)-induced inhibition of angiogenesis. *American Journal of Physiology-*

Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 280, n. 4, p. R994-R1000, 2001.

MAHON, J. M. et al. 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, v. 69, n. 1, p. 199-208, 1995.

MAYER, Jean; THOMAS, Donald W. Regulation of food intake and obesity. Science, v. 156, n. 3773, p. 328-337, 1967.

NAKANO-TATENO, Tae et al. Prolonged effects of intracerebroventricular angiotensin II on drinking, eating and locomotor behavior in mice. Regulatory peptides, v. 173, n. 1-3, p. 86-92, 2012.

OH, Young-Bin et al. Captopril intake decreases body weight gain via angiotensin-(1-7). Peptides, v. 37, n. 1, p. 79-85, 2012.

OHINATA, Kousaku et al. Angiotensin II and III suppress food intake via angiotensin AT2 receptor and prostaglandin EP4 receptor in mice. FEBS letters, v. 582, n. 5, p. 773-777, 2008.

PINHEIRO, Sergio Veloso Brant; SIMÕES E SILVA, Ana Cristina. Angiotensin converting enzyme 2, Angiotensin-(1-7), and receptor MAS axis in the kidney. International Journal of Hypertension, v. 2012, 2012.

PÖRSTI, Ilkka et al. Release of nitric oxide by angiotensin-(1-7) from porcine coronary endothelium: implications for a novel angiotensin receptor. 1994.

PÖRTER, James P. et al. Effect of central angiotensin II on body weight gain in young rats. Brain research, v. 959, n. 1, p. 20-28, 2003.

PÖRTER, James P.; POTRATZ, Kristen R. Effect of intracerebroventricular angiotensin II on body weight and food intake in adult rats. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 287, n. 2, p. R422-R428, 2004.

RICE, Gillian I. et al. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochemical Journal*, v. 383, n. 1, p. 45-51, 2004.

SAAD, Wilson Abrão; CAMARGO, Luiz Antonio de Arruda. Influence of angiotensin II receptor subtypes of the paraventricular nucleus on the physiological responses induced by angiotensin II injection into the medial septal area. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, v. 80, p. 401-405, 2003.

SANTOS, Edson L. et al. Essential role of TM V and VI for binding the C-terminal sequences of Des-Arg-kinins. *International immunopharmacology*, v. 8, n. 2, p. 282-288, 2008.

SANTOS, Edson Lucas et al. Long term treatment with ACE inhibitor enalapril decreases body weight gain and increases life span in rats. *Biochemical pharmacology*, v. 78, n. 8, p. 951-958, 2009.

SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Central and peripheral actions of angiotensin-(1-7). *Brazilian journal of medical and biological research= Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, v. 27, n. 4, p. 1033-1047, 1994.

SANTOS, Robson AS et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 14, p. 8258-8263, 2003.

SANTOS, Sérgio Henrique S. et al. Improved lipid and glucose metabolism in transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1-7). *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 30, n. 5, p. 953-961, 2010.

SATOH, Noriko et al. Pathophysiological significance of the obese gene product, leptin, in ventromedial hypothalamus (VMH)-lesioned rats: evidence for loss of its satiety effect in VMH-lesioned rats. *Endocrinology*, v. 138, n. 3, p. 947-954, 1997.

SCHIAVONE, Marc T. et al. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 85, n. 11, p. 4095-4098, 1988.

SILVA, Thalisson Henrique Martins. Participação dos receptores MAS da angiotensina 1-7 na regulação da sede e do apetite ao sódio. 2014.

STARBUCK, Elizabeth M.; FITTS, Douglas A. Influence of the subfornical organ on meal-associated drinking in rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 280, n. 3, p. R669-R677, 2001.

SUZUKI, Keisuke et al. The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation. *Endocrine journal*, v. 57, n. 5, p. 359-372, 2010.

SUZUKI, Keisuke; JAYASENA, Channa N.; BLOOM, Stephen R. Obesity and appetite control. *Experimental diabetes research*, v. 2012, 2012.

TIPNIS, Sarah R. et al. A human homolog of angiotensin-converting enzyme: cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 43, p. 33238-33243, 2000.

VALASSI, Elena; SCACCHI, Massimo; CAVAGNINI, Francesco. Neuroendocrine control of food intake. *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases*, v. 18, n. 2, p. 158-168, 2008.

VICKERS, Chad et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 17, p. 14838-14843, 2002.

WEIR, Matthew R.; DZAU, Victor J. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *American journal of hypertension*, v. 12, n. S9, p. 205S-213S, 1999.

WEISINGER, R. S. et al. The role of angiotensin II in ingestive behaviour: a brief review of angiotensin II, thirst and Na appetite. *Regulatory peptides*, v. 66, n. 1-2, p. 73-81, 1996.

WILLIAMS, Gareth; HARROLD, Joanne A.; CUTLER, David J. The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 59, n. 3, p. 385-396, 2000.

WOODS, Stephen C. Gastrointestinal satiety signals I. An overview of gastrointestinal signals that influence food intake. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 286, n. 1, p. G7-G13, 2004.

YAMAMOTO, Rie et al. Angiotensin II type 1 receptor signaling regulates feeding behavior through anorexigenic corticotropin-releasing hormone in hypothalamus. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 24, p. 21458-21465, 2011.

YOSHIDA, Tadashi et al. Angiotensin II reduces food intake by altering orexigenic neuropeptide expression in the mouse hypothalamus. *Endocrinology*, v. 153, n. 3, p. 1411-1420, 2012.