

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

TESE

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES AT₁ DO ÓRGÃO SUBFORNICAL NA
INTEGRAÇÃO ENTRE O EQUILÍBRIO HIDROELETROLÍTICO E
ENERGÉTICO**

BRUNO PAES LEME FERREIRA

2019



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES AT_1 DO ÓRGÃO SUBFORNICAL NA
INTEGRAÇÃO ENTRE O EQUILÍBRIO HIDROELETROLÍTICO E
ENERGÉTICO

BRUNO PAES LEME FERREIRA

Sob a orientação de
Prof. Dr. André de Souza Mecawi

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Fisiológicas**, no curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de concentração em Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Seropédica, RJ
Julho de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F383p Ferreira, Bruno Paes Leme, 1990-
Participação dos receptores AT1 do órgão subfornical na integração entre o equilíbrio hidroeletrolítico e energético / Bruno Paes Leme Ferreira. - Seropédica, 2019.
95 f.: il.

Orientador: André de Souza Mecawi.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2019.

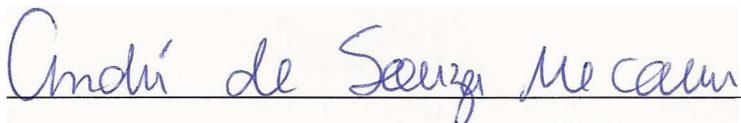
1. Órgão subfornical. 2. Angiotensina II. 3. Receptor para angiotensina do tipo 1. 4. Privação alimentar. 5. Eletrofisiologia. I. de Souza Mecawi, André, 1985-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

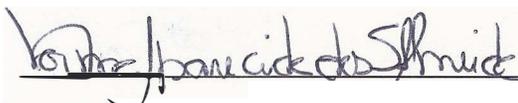
BRUNO PAES LEME FERREIRA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor **em Ciências Fisiológicas** no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas área de Concentração em: Fisiologia e Farmacologia.

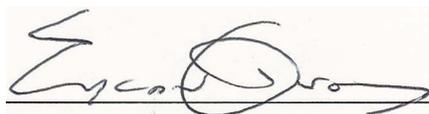
TESE APROVADA EM 30/07/2019



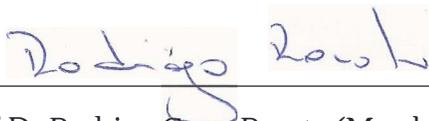
Prof Dr André de Souza Mecawi (Membro Interno ao Programa– Orientador - UNIFESP)



Profª Drª Norma Aparecida dos Santos Almeida (Membro Interno – UFRRJ)



Prof Dr Emerson Lopes Olivares (Membro Interno – UFRRJ)



Prof Dr Rodrigo Cesar Rorato (Membro Externo – UNAERP)



Prof Dr Eduardo Rebelato L. de Oliveira (Membro Externo – UNIFESP)

À Vanessa,

*Por ter me suportado todo este tempo de pós-
graduação, ter embarcado comigo na aventura que foi
termos vivido no Canadá como parte do doutorado, e
por ser o melhor exemplo de mulher, esposa, mãe e
companheira que eu poderia imaginar!*

Eu te amo!

Sempre te amei!

AGRADECIMENTOS

Agradecer a todos que contribuíram nesta etapa tão importante e longa como é o doutorado é uma árdua tarefa, especialmente quando se trata de um trabalho que envolve três universidades, sendo uma delas no exterior como sanduíche. Então, tentarei resumir aqui, em ordem cronológica, se posso dizer assim, meus mais sinceros agradecimentos àqueles que diretamente foram cruciais para o desenvolvimento desta tese.

Nos agradecimentos mais pessoais, começo agradecendo a Deus, por me dar forças para suportar todas as adversidades – que não foram poucas – e me ensinar através delas enquanto prossigo na tarefa de tentar entender os mistérios por Ele semeados que regem este mundo. A meus pais por sempre estarem presentes e a toda minha família também, inclusive a adquirida, na forma dos meus sogros. Obrigado por tudo!

Só quem vive na rotina de um laboratório, com todos os perrengues, problemas estruturais e a própria pressão da pós-graduação, sabe como é importante o suporte mútuo. E isso tenho muito a agradecer aos integrantes do nosso grupo, que são também grandes amigos Raoni (este ajudando até no Canadá), Livia (imprescindível na reta final), Viviane, Sabrina, Veronica, Edgard, Máyra, e aos ICs que apareceram pelo caminho e tanto me ajudaram direta ou indiretamente, Evandro, Quézia, William, Vitor, Gustavo, Carol, Milena.

Ainda na UFRRJ, tenho que agradecer à Raquel, que é muito mais que uma técnica, mas uma grande amiga, e também à Bruna, a quem com tanta paciência me aturou a pedir animais e para autoclavar material. Aos professores do departamento, não posso deixar de demonstrar meu agradecimento e admiração aos mestres Wellington, Emerson, David, Norma, Magda, Bruno e a todos aos quais tive o prazer de trabalhar. Mas um agradecimento especial vai ao mestre Luís que, com toda sua sapiência e ocupações mil, não se furta de discussões que transcendem o meio científico e fazem jus ao título a qual estou aplicando, o de doutor da filosofia (*Philosophiae Doctor*, PhD). Muito obrigado pela paciência e pela co-orientação prestada desde a graduação. E, obviamente, quando o assunto se trata de professores, devo um agradecimento mais que especial a meu orientador, André, por ter aceitado o convite para me orientar, e ter confiado a mim um doutorado sanduíche que mudou minha vida nos mais diversos aspectos. Muita gratidão a todos.

Regarding my time in Canada, it's quite hard to summarize what those 15 months meant to me. It was a life-change experience and I came back from there a totally new person. And of course, it was an honor to work with Alastair Ferguson and having my very first paper published as first author with him, after using several of his groundbreaking works with PVN neurons in my Master's dissertation (not yet knowing I would come to work with him). To all members of Al's lab by the time, Nick, Nikki, Emily, Hanna, Spencer, Sebastian, Anusha, Susan, Kethleen and Pauline, my truest gratitude to you all! Richard, thank you very very much for bearing us! I love you, man! Charlie and D, and sons: you made my experience in Canada much smoother and much more pleasant! Gigi, Shawn and Gabriela, you have come to us in such troubled moments, we'll never ever repay all you've done and all you mean to us! Ana, Fabio, Luana, Luca, Lars e Evelim, obrigado por receberem a mim e a Vanessa e Miguel/Logan como parte da família de vocês. Nunca nos esqueceremos de vocês! Luciano, Tati e Sara, vocês são tão especiais para nós! Obrigado por todo carinho tanto no Canadá como de volta ao Brasil. Kenadja e Eddie, muitíssimo obrigado por tudo, e muito obrigado a todos amigos que fizemos no Canadá. Vocês são parte da minha história.

De volta ao Brasil, ainda tive o imenso prazer de trabalhar na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP, no laboratório do professor José Antunes-Rodrigues, maior neuroendocrinologista do Brasil, cujos títulos e honrarias se esmorecem perante a simplicidade e solicitude em ajudar (tive o prazer de tê-lo me ajudando a coletar umas amostras do experimento, e essa experiência não tem preço). Lá tive o prazer de conviver com pessoas tão capacitadas e nem por isso menos acessíveis como Guil, Susana, Juliana, Lucas, Wagner, Fernanda, Hellen, Sabrina, Rafaella, as incríveis técnicas Milene e Val e, certamente a professora Lucila, outra pessoa maravilhosa as quais fizeram minha passagem por lá, longe de esposa e filho por semanas, menos dura e exaustiva.

Também presto meus agradecimentos às agências de fomento, pela bolsa do Ciências sem Fronteiras para doutorado sanduíche no programa Professor Visitante Especial (bolsa número 88887.116000/2016-00). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 "This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001".

E para finalizar meus agradecimentos, dedico este espaço àquela que também é dedicado esta tese: Vanessa. Não só por ser minha companheira e o amor da minha vida, mas também por ter me aturado todos estes anos neste período que é tão complicado, cheio de renúncias seja por estar escrevendo, ou por fazer experimentos até altas horas da noite, ou por fazer experimento a distância. Neste período juntos e passando por tudo que passamos, só passo a te valorizar a cada dia mais. Obrigado por embarcar comigo neste período e por ter me acompanhado até o Canadá. Foi uma experiência maravilhosa, onde você nos deu nosso maior presente: Miguel! Se não tem sido fácil pra mim lidar com a pressão do doutorado com nossa pequena bênção, muito esperto e bem agitado, imagino para você, Vanessa, que teve que lidar com ele mesmo na minha ausência! Vocês são minha família e meu maior presente. E se tem um motivo que me impulsiona a seguir em frente, é poder dar a melhor vida que vocês merecem! Obrigado por serem minha inspiração!

By the Law of the Jungle it is death to kill at the
drinking-places when once the Water Truce has been declared.
The reason of this is that drinking comes before eating.

Rudyard Kipling, "The Second Jungle Book", 1884

RESUMO

Paes-Leme, Bruno. **Participação dos receptores AT₁ do órgão subfornical na integração entre o equilíbrio hidroeletrolítico e energético.** 2019. 95p. Tese (doutorado em Ciências Fisiológicas). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Embora classicamente envolvido no controle cardiovascular e equilíbrio hidromineral, o sistema renina-angiotensina (SRA) tem sido implicado no controle do balanço energético. A angiotensina II (ANG II), atuando em receptores do tipo 1 (AT₁) pode alterar a ingestão alimentar e o ganho de peso em modelos para indução de obesidade. Um dos principais locais de ação da ANG II circulante no sistema nervoso central é o órgão subfornical (SFO), desprovido de barreira hematoencefálica e relacionado com o controle de diversas funções autonômicas, comportamentos motivados e do metabolismo energético. Assim, nossa hipótese é que a ANG II pode atuar em receptores AT₁ para promover o controle integrado do metabólico e hidroeletrolítico em desafios à homeostase energética. Tem-se três objetivos principais: a) investigar se um mesmo neurônio do SFO é sensível a ANG II e glicose, e se a concentração de glicose influencia a resposta à ANG II; b) avaliar se a privação alimentar, como estímulo hipoglicemiante, pode alterar a atividade do SRA circulante e a expressão de AT₁ no SFO; c) e avaliar se a ANG II via receptores AT₁ influencia a ingestão de ração e/ou água após a privação alimentar. Para tal, foram usados ratos machos Sprague-Dawley e Wistar e todos os procedimentos foram aprovados por comitês de ética em uso de animais experimentais, respectivamente Queen's University 2017-1735 e FMRP-USP 229/18. Observou-se que neurônios do SFO que respondem a ANG II podem ser encontrados em populações de diferentes fenótipos de glicossensibilidade, podendo ser tanto não glicossensíveis (43%), como glicoexcitáveis (52%) ou glicoinibidos (71%). Cultura de células do SFO mantidas em diferentes concentrações de glicose por 1, 6 e 24 horas não apresentaram diferença na expressão de receptores AT₁. Mesmo assim, estudos eletrofisiológicos de *patch-clamp* de neurônios isolados do SFO mostraram que aproximadamente 31% (n=4/13) das células testadas não respondiam a ANG II a 5mM de glicose e passavam a apresentar despolarização a 10mM de glicose. Isso sugere uma inter-relação entre o estado metabólico do organismo e a forma como o sistema nervoso central responde à ANG II. A privação de alimentos induziu o aumento da concentração plasmática de ANG II e do mRNA para receptores AT_{1a} no SFO. O tratamento com losartana, um antagonista AT₁, em baixas doses na água de beber durante 48h de jejum atenuou a queda da glicemia. Quando os animais receberam comida, apenas uma tendência de aumento da ingestão alimentar foi observada aos 60 min no grupo tratado com losartana na água. Entretanto, neste mesmo tempo, foi observada uma redução significativa da ingestão de água. Ainda, microinjeções intracerebroventriculares (i.c.v.) de losartana mostram uma significativa diminuição da ingestão comida e água após 12 horas em condições basais, mas depois de jejum de 48 horas apenas a ingestão de água foi significativamente reduzida pelo tratamento com losartana i.c.v. Assim, podemos concluir que SRA encontra-se ativado em condições de jejum, acompanhado de aumento na expressão de AT₁ no SFO, e está relacionado com a ingestão de água durante a alimentação, como um importante mecanismo de manutenção do volume e osmolalidade do líquido extracelular durante a ingestão de alimentos.

Palavras chaves: Órgão subfornical, Angiotensina II; Receptor para angiotensina do tipo 1; Privação alimentar; Eletrofisiologia.

ABSTRACT

Paes-Leme, Bruno. **Role of AT₁ receptors at the subfornical organ, in the integration of hydroelectrolytic and energetic balance.** 2019. 95p. Thesis (PhD in Physiological Sciences). Institute of Biological Sciences and Health, Department of Physiological Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Although classically involved in cardiovascular control and hydromineral balance, the renin-angiotensin system (SRA) has been implicated in energy balance control. Angiotensin II (ANG II) stimulating its type 1 receptor (AT₁) may change body weight and food ingestion in some experimental models of obesity. One of the main sites of action of circulating ANG II is the subfornical organ (SFO), a circumventricular organ related to the control of several autonomic functions, motivated behaviors, and energetic metabolism. Thus, our hypothesis is that ANG II may act on AT₁ receptors to promote an integrate control of metabolic and hydroelectrolytic balance during challenges of energetic homeostasis. This thesis aims three main goals: a) investigate if a same SFO neuron is sensitive to ANG II and glucose, and if glucose concentration may influence this cell's response to ANG II; b) evaluate if food deprivation, as a hypoglycemic stimulus, may alter systemic SRA activity and AT₁ expression at SFO; c) and evaluate if ANG II through AT₁ may influence food and/or water ingestion after food deprivation. Male Wistar and Sprague-Dawley male rats were used and all procedures have been approved by ethics committees in experimental animal use, respectively: Queen's University 2017-1735 and FMRP-USP 229/18. SFO neurons that responded to ANG II may be found in different phenotype populations of glucosensing, either non-glucosensitive (43%), glucoexcited (52%) or glucoinhibited (71%). Cultures of SFO cells grown at different glucose concentrations for 1, 6 or 24h did not change expression of AT₁ receptors. Nevertheless, electrophysiological studies, shows that approximately 31% (n=4/13) of tested SFO neurons didn't responded to ANG II at 5mM glucose medium but depolarized to ANG II at 10mM. It suggests that metabolic state of the organism may change the way the central nervous system respond to ANG II. Food deprivation lead to and increased plasmatic concentration of ANG II and of mRNA for AT_{1a} receptors at SFO. Treatment with losartan (an AT₁ blocker) at low doses in drinking water, for 48h fasting attenuated the glycemic drop. After access to food was reestablished, there's only a tendency of decrease of food ingestion at 60 min in the group treated with losartan. By that same one-hour period, this same group exhibited a significative reduction in water intake. Yet, after 12 hours of intracerebroventricular (i.c.v.) microinjections of losartan lead to food and water ingestion decrease in basal condition, while after a 48h fasting, only water ingestion was significantly decreased 12h after losartan i.c.v. Though we might conclude that SRA is activated in fasting conditions, followed to an increase in AT₁ expression at SFO, which is related to water ingestion during feeding, as an important mechanism of maintenance of volume and osmolality of extracellular fluid during food ingestion.

Key words: Subfornical organ, angiotensin II, Type 1 angiotensin receptor; Food deprivation; Electrophysiology;

LISTA DE ABREVIACOES

° C	graus Celsius
µg	microgramas
µL	microlitros
µm	micrmetros
µM	micromolar
2 ^{ΔΔCt}	dois delta delta Ct, onde Ct significa ciclo limiar (<i>Cycle threshold</i>)
a.u.	unidade arbitrárias (do inglês <i>arbitrary unities</i>)
aCSF	líquido cefalorraquidiano artificial (do inglês <i>artificial cerebrospinal fluid</i>)
ACTH	hormônio adrenocorticotrófico (do inglês <i>adrenocorticotropic hormone</i>)
ANG	angiotensina
ANOVA	análise de variância
ARB	antagonista de receptores de angiotensina (sigla em inglês para <i>angiotensin receptor blocker</i>)
AT ₁	receptor para angiotensina do tipo 1
AT ₂	receptor para angiotensina do tipo 2
AT ₃	receptor para angiotensina do tipo 3
AT ₄	receptor para angiotensina do tipo 4
AVP	arginina vasopressina
BHE	barreira hematoencefálica
C ₆ H ₁₁ KO ₇	gluconato de potássio
Ca ²⁺	cálcio
CaCl ₂	cloreto de cálcio
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar (da sigla em inglês <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
CEUA	Comit de tica em Uso de Animais
cGMP	monofosfato cíclico de guanosina (da sigla em inglês <i>cyclic guanosine monophosphate</i>)
CO ₂	monóxido de carbono
cpm	contagem por minuto
DAG	diacilglicerol
dL	decilitro
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	cido desoxirribonucleico (da sigla em inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>)
ECA	enzima conversora de angiotensina
EDTA	cido etilenodiamino tetra-acético (da sigla em inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EGTA	cido egtzico (da sigla em inglês para <i>ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i> ou <i>egtazic acid</i>)
g	gramas
G	força G
GE	neurônios glicoexciveis
GI	neurônios glicoinibidos
h	hora
HDL	lipoproteína de alta densidade (da sigla em inglês <i>high density lipoprotein</i>)

HEPES	composto comercial cujo nome se refere ao nome em inglês 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HHA	hipotálamo-hipófise-adrenal
i.c.v.	intracerebroventricular
ICBS	Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
iECA	inibidor da enzima conversora de angiotensina
IP₃	inositol trifosfato (da sigla em inglês para <i>inositol 1,4,5-trisphosphate</i>)
K⁺	potássio
K_{ATP}	canal para potássio dependente de adenosina trifosfato (da sigla em inglês para <i>adenosine triphosphate dependent potassium channel</i>)
KCl	cloreto de potássio
kg	quilograma
KH₂PO₄	fosfato monopotássico (da sigla em inglês para <i>potassium phosphate monobasic</i>)
L	litro
MAPK	quinases proteicas ativadas por mitógenos (da sigla em inglês para <i>mitogen activated protein kinases</i>)
MC4R	receptor para melanocortina do tipo 4 (da sigla em inglês <i>melanocortin 4 recptor</i>)
mEq	miliquivalentes
mg	miligramas
MgCl₂	cloreto de magnésio
MgSO₄	sulfato de magnésio
min	minutos
mL	mililitros
mM	milimolar
mm	milímetros
mmol	milimolar
mosm	miliosmóis
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro (da sigla em inglês <i>messenger ribonucleic acid</i>)
mV	milivolts
MΩ	mili-ohms
Na⁺	sódio
NaATP	sal de adenosina trifosfato (da sigla em inglês para <i>adenosine triphosphate</i>)
NaCl	cloreto de sódio
NaHCO₃	bicarbonato de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
nGS	neurônios não-glicossensíveis
nm	nanômetros
nM	nanomolar
NO	óxido nítrico
OCV	órgão circunventricular
OVLT	órgão vascular da lâmina terminal
pg	picrograma
PGH₂	prostaglandina H ₂
pH	potencial hidrogeniônico
PKC	proteína quinase C (da sigla em inglês para <i>protein kinase C</i>)

PLC..... fosfolipase C (da sigla em inglês para *phospholipase C*)
PMSF..... fenilmetilsulfonil fluoreto (da sigla em inglês para *phenylmethylsulfonyl fluoride*)
PPAR..... receptor ativado por proliferador de peroxissoma (da sigla em inglês para *peroxisome proliferator-activated receptors*)
PVN..... núcleo paraventricular (da sigla em inglês para *paraventricular nucleus*)
rpm..... rotações por minuto
RT-qPCR..... reação em cadeia da polimerase em tempo real com transcriptase reversa (da sigla em inglês para *reverse transcriptase real-time polymerase chain reaction*)
s..... segundos
SC..... subcutâneo
SFO..... órgão subfornical (da sigla em inglês para *subfornical organ*)
SGLT..... transportador de sódio e glicose (da sigla em inglês para *sodium-glucose transporter*)
SNC..... sistema nervoso central
SNS..... sistema nervoso simpático
SRA..... sistema renina-angiotensina
TFA..... ácido trifluoroacético (da sigla em inglês para *trifluoroacetic acid*)
TGI..... trato gastrointestinal
U.I...... unidades internacionais
UFRRJ..... Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
USP..... Universidade de São Paulo
V_m..... potencial de membrana

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão simplificada do sistema renina-angiotensina (SRA). A figura esquemática mostra alguns componentes do SRA clássico, mostrados em negrito, enquanto os eixos mais recentes envolvendo angiotensina (1-7) e receptores Mas estão representados em itálico. Estão também resumidas algumas funções do SRA envolvendo especialmente o controle do equilíbrio hidroeletrólítico e da pressão arterial. Adaptado de Schweda (2015). 31

Figura 2. Integração entre obesidade, resistência insulínica e ativação do SRA e do SNS na fisiopatologia da hipertensão na síndrome metabólica. Insulin: insulina; SNS activity: atividade do sistema nervoso simpático; Vascular tone: tônus vascular; Noradrenaline re-uptake inhibition: inibição da recaptação de noradrenalina; Mineralocorticoid releasing factors: fatores de liberação de mineralocorticoides; Angiotensinogen: angiotensinogênio; Hypertension: hipertensão; NO production: produção de óxido nítrico; Na⁺ reabsorption: Reabsorção de Na⁺; Volume expansion: expansão de volume. Fonte: Manrique et al (2009). 32

Figura 3. Expressão de mRNA para AT₁ em cultura celular do SFO em diferentes concentrações de glicose. Gráficos mostram os resultados para RT-qPCR de células do SFO cultivadas em três diferentes concentrações de glicose (1mM, 5mM e 10mM) em três tempos diferentes (1h, 6h e 24h). ** P<0,01; *** P<0,0001 comparado com o mesmo grupo à 1h. 49

Figura 4. Classificação de neurônios do SFO de acordo com as alterações de concentração de glicose. Segmentos representativos de registros current-clamp de diferentes respostas a alteração de glicose. A, B e C são neurônios incubados e inicialmente registrados a glicose a 10mM (cinza) e resposta à glicose foi evocada pela diminuição da concentração de glicose a 5mM (branco). Neurônios que hiperpolarizam quando a concentração de glicose diminui foram classificados como glicoe excitáveis (GE, A), neurônios que despolarizam foram classificados como glicoinibidos (GI, B), e neurônios que não alteram seu potencial de membrana foram considerados como não-glicossensíveis (nGS, C). D e E mostram registros representativos de neurônios incubados e inicialmente registrados a 5mM de glicose e depois alterado a 10mM. Neste protocolo, neurônios que despolarizam em resposta ao aumento na concentração de glicose foram classificados como GE (D), enquanto neurônios que hiperpolarizam foram considerados como GI (E). Linha pontilhada representa o potencial de membrana basal. Barra de escala: 10mV x 100s. 51

Figura 5. Magnitude de resposta de cada neurônio do SFO as alterações de glicose no meio de registro. Distribuição da magnitude de resposta à glicose nos neurônios do SFO testados (n=90). Preto corresponde aos neurônios não-glicossensíveis (nGS), cinza claro aos glicoinibidos (GI) e cinza escuro aos glicoe excitáveis (GE). Círculos abertos correspondem às células inicialmente registrados a 5mM e a resposta a glicose era testada aumentando para 10mM; Neste caso, neurônios GI eram identificados por hiperpolarização e GE por despolarização. Círculos fechados são células que eram inicialmente registradas a 10mM de glicose e eram alteradas para 5mM para testar a responsividade a glicose. Células que despolarizam eram classificadas como GI e as que respondiam com hiperpolarização eram classificadas como GE. 51

Figura 6. Resposta a angiotensina II em neurônios do SFO com diferentes perfis de glicossensibilidade. Segmentos representativos de registros current clamp de resposta a angiotensina II de neurônios glicoinibidos (A), não-glicossensíveis (B) e glicoe excitáveis (C). Barras pretas correspondem ao momento onde a angiotensina II era perfundida no banho. Linhas pontilhadas representam o potencial de membrana basal. Barra de escala: 10mV x 50s. 52

Figura 7. Distribuição da magnitude de resposta a angiotensina II de acordo com o perfil de glicossesibilidade em neurônios do SFO. Neurônios que despolarizam (cinza) ou não respondiam (branco) à aplicação de angiotensina II divididos por sua resposta a glicose, tanto como glicoinibidos (GI), glicoe excitáveis (GE) ou não-glicossensíveis (nGS). A proporção das respostas à angiotensina II está demonstrada em valores numéricos e mostram que a proporção de neurônios GI são os que tem mas maiores respostas a ANG II. 52

Figura 8. Resposta à angiotensina II em duas diferentes concentrações de glicose em neurônios do SFO. Traçados representativos de registros de current-clamp de A) um neurônio que responde a angiotensina II (ANG II, barras pretas) tanto a 5mM de glicose (barras brancas) como a 10mM (barras cinzas); e B) um neurônio que não respondia a 5mM mas respondeu a 10mM de glicose. Linhas tracejadas representam o potencial de membrana basal. A proporção e a magnitude de resposta a ANG II tanto em 5mM como em 10mM de glicose são mostrados em C e D respectivamente. Em D, quadrados representam neurônios cuja classificação da resposta foi dada pela alteração da frequência de disparos ao invés do potencial de membrana. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ 53

Figura 9. Variação de peso corporal durante privação alimentar. A) Variação cumulativa de peso corporal por dia após 24h (quadrado cinza) e 48h de jejum (triângulo preto), comparado aos animais com livre acesso a ração (controle, círculo branco). Seta a esquerda mostra momento em que houve a retirada da ração do grupo 48h Jejum, e seta a direita mostra o momento da retirada da ração do grupo 24h Jejum. B) Variação diária do peso corporal após 24h e 48h do início do experimento. ANOVA de uma via; **** $P < 0,0001$ comparado ao controle; + $P < 0,05$ e + + + + $P < 0,0001$ comparado ao grupo jejum de 24h. 54

Figura 10. Glicemia e níveis plasmáticos de corticosterona e AVP de animais mantidos em privação alimentar de 24h e 48h. Glicemia (A) e níveis plasmáticos de corticosterona (B) e vasopressina [AVP (C)] após 24h (cinza) e 48h (preto) de jejum comparados a seu controle (branco). ANOVA de uma via; * $P \leq 0,05$; ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$ 55

Figura 11. Níveis plasmáticos de angiotensinas e expressão de AT_{1a} no SFO de animais mantidos em privação alimentar de 24h e 48h. Níveis plasmáticos de angiotensina II (A) e angiotensina I (B) e expressão relativa de mRNA para AT_{1a} no SFO (C) de animais mantidos em jejum por 24h (cinza) e 48h (preto) comparados a seu controle (branco). ANOVA de uma via; * $P \leq 0,05$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$ 56

Figura 12. Ingestão de fluidos e volume urinário após 24h e 48h de jejum de animais com acesso exclusivo a água ou a losartana na água de beber. Valores padronizados pelo peso corporal de ingestão de fluidos (A) e volume urinário excretado (B) diários, ambas expressas em mL/100g após 24h e 48h dos grupos com acesso a água filtrada com e sem privação alimentar (respectivamente Água/Jejum e Água/Ração) e dos grupos com acesso exclusivo a solução de losartana como única fonte hídrica com e sem acesso a ração ad libitum (respectivamente LOS/Ração e LOS/Ração). ANOVA de duas vias, e significância demonstrada entre os desafios no mesmo tempo; * $P \leq 0,05$; **** $P < 0,0001$ 58

Figura 13. Hematócrito e sódio plasmático após 48h de privação alimentar. Gráficos resumem os dados de volume globular [hematócrito, expresso em % (A)] e sódio plasmático [mEq/L (B)] em condições de jejum e controle com ração ad libitum de animais bebendo água filtrada ou solução de losartana como única fonte de fluidos. * $P < 0,05$ 58

Figura 14. Variação de peso corporal, ingestão padronizada de ração e glicemia após 24h e 48h de jejum de animais com acesso exclusivo a água ou a losartana na água de beber. O gráfico A mostra a variação de peso corporal (g) comparado ao último peso registrado nos tempos de 24h e 48h

de animais com acesso a água filtrada com e sem privação alimentar (grupos Água/Jejum e Água/Ração, respectivamente) e dos grupos com acesso exclusivo a solução de losartana como única fonte hídrica com e sem livre acesso a ração (grupos LOS/Ração e LOS/Ração, respectivamente). O gráfico B mostra a ingestão de comida padronizada pelo peso corporal expressa em g/100g após 24h e 48h dos grupos Água/Ração e LOS/Ração. Em C tem-se a glicemia (mg/dL) dos grupos experimentais em condições basais e após jejum de 24h ou 48h dos mesmos grupos. ANOVA de duas vias, com demonstração da participação do fator tratamento; ** P<0,01; ***<0,001 **** P<0,0001. # P<0,05 quando comparado LOS/Jejum contra Água/Jejum no pós-teste de Bonferroni..... 60

Figura 15. Ingestão cumulativa de comida na reapresentação de ração após 48h de privação alimentar em animais com acesso exclusivo a água ou a losartana na água de beber. A) Gráfico mostra ingestão cumulativa de ração nos tempos de 30, 60, 120, 180, 240 e 720 minutos após reapresentação de comida aos grupos que passaram por jejum de 48h recebendo água ou losartana como a única fonte hídrica (Água/Jejum e LOS/Jejum, respectivamente) e os que tiveram acesso a comida ad libitum e recebiam água ou jejum (Água/Ração e LOS/Ração, respectivamente). B) Ingestão de ração cumulativa no tempo de uma hora após a reapresentação de ração; asteriscos indicam significância da participação do desafio na ANOVA de duas vias. ****P<0,0001..... 62

Figura 16. Ingestão cumulativa de água na reapresentação de ração após 48h de privação alimentar em animais com acesso exclusivo a água ou a losartana na água de beber. A) Gráfico mostra ingestão cumulativa de água nos tempos de 30, 60, 120, 180, 240 e 720 minutos após reapresentação de comida aos grupos que passaram por jejum de 48h recebendo água ou losartana como a única fonte líquida (Água/Jejum e LOS/Jejum, respectivamente) e os que tiveram acesso a comida ad libitum e recebiam água ou jejum (Água/Ração e LOS/Ração, respectivamente). Asteriscos indicam diferença nas múltiplas comparações entre os grupos Água/Jejum e LOS/Jejum. B) Ingestão de ração cumulativa no tempo de uma hora após a reapresentação de ração; asteriscos indicam significância da participação do desafio na ANOVA de duas vias; tralha indica diferença nas múltiplas comparações entre LOS/Jejum contra Água/Jejum. **P<0,001; ****P<0,0001; # P<0,01..... 63

Figura 17. Variação de peso corporal e volume urinário na reapresentação de água após 48h de privação alimentar em animais com acesso exclusivo a água ou a losartana na água de beber. O gráfico A mostra a variação de peso corporal (g) cumulativo nos tempos de 4h e 12h após a reapresentação de ração de animais com acesso a água filtrada com e sem privação alimentar (grupos Água/Jejum e Água/Ração, respectivamente) e dos grupos com acesso exclusivo a solução de losartana como única fonte hídrica com e sem livre acesso a ração (grupos LOS/Ração e LOS/Ração, respectivamente). O gráfico B mostra o volume de excreção urinária padronizada pelo peso corporal expressa em mL/100g após 4h e 12h dos mesmos grupo. ANOVA de duas vias, e significância para o fator desafio; *P<0,05; **** P<0,0001..... 65

Figura 18. Ingestão de ração cumulativa após microinjeção intracerebroventricular de angiotensina II ou losartana em condições basais. A) Gráfico mostra os valores de ingestão de alimentos padronizado pelo peso corporal (g/100g) nos tempos de 30, 60, 120, 180, 240 e 720 minutos entre os grupos veículo (círculo aberto), angiotensina II (quadrado cinza) e losartana (triângulo preto) em condições basais de ingestão espontânea. Resultados das múltiplas comparações da ANOVA de duas vias avaliados em comparação com grupo veículo. B) Ingestão de ração cumulativa no tempo de uma hora após a microinjeção i.c.v. em condições basais de veículo (barra branca), ANG II (cinza) ou losartana (preta). ****P<0,0001 comparado ao controle..... 67

Figura 19. Ingestão de água cumulativa após microinjeção intracerebroventricular de angiotensina II ou losartana em condições basais. A) Gráfico mostra os valores de ingestão hídrica padronizado pelo peso corporal (mL/100g) nos tempos de 30, 60, 120, 180, 240 e 720 minutos entre os grupos veículo (círculo aberto), angiotensina II (quadrado cinza) e losartana (triângulo preto) em

condições basais de ingestão espontânea. Resultados das múltiplas comparações da ANOVA de duas vias avaliados em comparação com grupo veículo. B) Ingestão de água cumulativa no tempo de uma hora após a mincroinjeção i.c.v. em condições basais de veículo (barra branca), ANG II (cinza) ou losartana (preta). **P<0,01 entre os grupos experimentais contra o controle. 68

Figura 20. Ingestão de ração cumulativa após microinjeção intracerebroventricular de angiotensina II ou losartana após 48h de jejum. Gráfico A mostra os valores de ingestão alimentar padronizado pelo peso corporal (g/100g) nos tempos de 30, 60, 120, 180, 240 e 720 minutos entre os grupos veículo (círculo aberto), angiotensina II (quadrado cinza) e losartana (triângulo preto) na reapresentação de ração após 48h de jejum. Resultados das múltiplas comparações da ANOVA de duas vias avaliados em comparação com grupo veículo. B) Ingestão de água cumulativa no tempo de uma hora após a mincroinjeção i.c.v. após 48h de jejum de veículo (barra branca), ANG II (cinza) ou losartana (preta). 70

Figura 21. Ingestão de água cumulativa após microinjeção intracerebroventricular de angiotensina II ou losartana após 48h de jejum. Gráfico A mostra os valores de ingestão hídrica padronizado pelo peso corporal (mL/100g) nos tempos de 30, 60, 120, 180, 240 e 720 minutos entre os grupos veículo (círculo aberto), angiotensina II (quadrado cinza) e losartana (triângulo preto) na reapresentação de ração após 48h de jejum. Resultados das múltiplas comparações da ANOVA de duas vias avaliados em comparação com grupo veículo. B) Ingestão de água cumulativa no tempo de uma hora após a mincroinjeção i.c.v. após 48h de jejum de veículo (barra branca), ANG II (cinza) ou losartana (preta). *P≤0,05; **P<0,01 entre os grupos experimentais contra o controle. 71

Figura 22. Peso corporal 4h e 12h após microinjeção intracerebroventricular injeção de angiotensina II e losartana em condições basais e após 48h de privação alimentar. Gráficos mostram os dados de variação de peso corporal cumulativo após 4h e 12h de microinjeção intracerebrovetricular de veículo (branco), angiotensina II (cinza) e losartana (preto) em condições basal (A) e depois de 48h de jejum (B). 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores da ingestão cumulativa de ração padronizado pelo peso corporal após privação alimentar de 48h.....	62
Tabela 2. Valores da ingestão cumulativa de fluidos (água filtrada ou solução de losartana) padronizado pelo peso corporal após privação alimentar de 48h.....	63
Tabela 3. Valores da ingestão de ração padronizada pelo peso corporal após microinjeção intracerebroventricular de angiotensina II ou losartana em condições basais.....	67
Tabela 4. Valores da ingestão de água padronizada pelo peso corporal após microinjeção intracerebroventricular de angiotensina II ou losartana em condições basais.....	68
Tabela 5. Valores da ingestão de ração padronizada pelo peso corporal após microinjeção intracerebroventricular de angiotensina II ou losartana depois de reapresentação de comida após 48h de jejum.....	70
Tabela 6. Valores da ingestão de água padronizada pelo peso corporal após microinjeção intracerebroventricular de angiotensina II ou losartana depois de reapresentação de comida após 48h de jejum.....	71

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	27
2. REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1. O SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA	29
2.2. ALTERAÇÕES METABÓLICAS E DISTÚRBIOS CARDIOVASCULARES MEDIADOS PELO SRA	31
2.3. O ÓRGÃO SUBFORNICAL COMO INTEGRADOR CENTRAL DE SINAIS PERIFÉRICOS.....	33
3. OBJETIVOS	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1. ANIMAIS E APRECIÇÃO ÉTICA DE SEU USO.....	39
4.2. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	39
4.3. EXPERIMENTO I: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE SOBRE A EXPRESSÃO DOS RECEPTORES AT _{1A} EM CULTURA DE CÉLULAS DISSOCIADAS DO SFO	40
4.3.1. Preparação de neurônios do SFO.....	40
4.3.2. Incubação de células do SFO e protocolo geral de RT-qPCR.....	41
4.4. EXPERIMENTO II: CARACTERIZAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DE NEURÔNIOS ISOLADOS DO SFO RESPONSIVOS A ANG II QUANTO A SENSIBILIDADE A GLICOSE.....	41
4.4.1. Preparação de neurônios do SFO.....	41
4.4.2. Eletrofisiologia.....	42
4.5. EXPERIMENTO III: EFEITO DA PRIVAÇÃO ALIMENTAR NO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA PERIFÉRICO E EXPRESSÃO DE RECEPTORES AT _{1A} NO SFO	43
4.5.1. Extração de RNA e síntese de cDNA para RT-qPCR.....	43
4.5.2. Radioimunoensaio para dosagem hormonal.....	44
4.6. EXPERIMENTO IV: EFEITO DA PRIVAÇÃO ALIMENTAR NO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA PERIFÉRICO E EXPRESSÃO DE RECEPTORES AT _{1A} NO SFO	45
4.6.1. Preparo da solução de losartana na água de beber	45
4.6.2. Comportamento ingestivo em gaiola metabólica	45
4.6.3. Hematócrito.....	46
4.6.4. Sódio plasmático	46
4.7. EXPERIMENTO V: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ANGIOTENSINA II E LOSARTANA INTRACEREBROVENTRICULAR EM CONDIÇÕES BASAIS E APÓS PRIVAÇÃO ALIMENTAR	46
4.7.1. Cirurgia estereotáxica para implante de cânula-guia no ventrículo lateral.....	46
4.7.2. Gaiola metabólica e microinjeção i.c.v.....	47
4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
5. RESULTADOS	49
5.1. EXPERIMENTO I: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE SOBRE A EXPRESSÃO DOS RECEPTORES AT _{1A} EM CULTURA DE CÉLULAS DISSOCIADAS DO SFO	49
5.2. EXPERIMENTO II: CARACTERIZAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DE NEURÔNIOS ISOLADOS DO SFO RESPONSIVOS A ANG II QUANTO A SENSIBILIDADE A GLICOSE	50
5.2.1. Perfil de glicossensibilidade de neurônios responsivos a ANG II	50
5.2.2. Resposta a ANG II em diferentes concentrações de glicose.....	53
5.3. EXPERIMENTO III: EFEITO DA PRIVAÇÃO ALIMENTAR NO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA PERIFÉRICO E EXPRESSÃO DE RECEPTORES AT _{1A} NO SFO	54
5.3.1. Variação de Peso Corporal.....	54
5.3.2. Glicemia e níveis plasmáticos de corticosterona e AVP	55
5.3.3. Concentração plasmática de ANG I e II e expressão de nRNA para AT _{1a} no SFO.....	56
5.4. EXPERIMENTO IV: EFEITO DO BLOQUEIO PERIFÉRICO DE RECEPTORES AT ₁ NA INGESTÃO ALIMENTAR E HÍDRICA APÓS PRIVAÇÃO ALIMENTAR.....	57

5.4.1.	<i>Ingestão de fluidos, dose da losartana, excreção urinária, hematócrito e sódio plasmático no jejum</i>	57
5.4.2.	<i>Peso corporal, ingestão de ração e glicemia durante jejum e tratamento com losartana</i>	59
5.4.3.	<i>Ingestão de ração e fluidos após reapresentação de alimentos</i>	61
5.4.4.	<i>Peso corporal e volume urinário após reapresentação de alimentos</i>	64
5.5.	<i>EXPERIMENTO V: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ANGIOTENSINA II E LOSARTANA INTRACEREBROVENTRICULAR EM CONDIÇÕES BASAIS E APÓS PRIVAÇÃO ALIMENTAR</i>	66
5.5.1.	<i>Ingestão de ração e água após microinjeção i.c.v. em condições basais</i>	66
5.5.2.	<i>Ingestão de ração e de água após microinjeção i.c.v. depois de 48h de jejum</i>	69
5.5.3.	<i>Variação do peso corporal em condições basal e após privação de 48h</i>	69
6.	DISCUSSÃO	73
7.	CONCLUSÃO	81
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

1. INTRODUÇÃO

O sistema renina-angiotensina (SRA) é classicamente relacionado ao equilíbrio hidroeletrolítico e cardiovascular para manutenção do volume do líquido extracelular e da pressão arterial. O principal efector deste sistema é a angiotensina II (ANG II), um dos principais estímulos dipsogênicos conhecidos, que ainda apresenta uma notória ação vasoconstritora, que lhe conferiu seu nome.

Estudos mostram que a manipulação farmacológica central ou periférica com ANG II ou antagonista de seu receptor do tipo 1 (como losartana, por exemplo) é capaz de alterar, além da ingestão hídrica, a ingestão de alimentos. Por tempos atribuiu-se este efeito como reflexo de um aumento ou diminuição da ingestão de água. Entretanto, algumas evidências sugerem que a ANG II pode ter participação mais direta nos circuitos neurais que regulam o comportamento motivado de ingestão alimentar.

Distúrbios metabólicos, como a síndrome metabólica, são comumente associados a alterações cardiovasculares, especialmente hipertensão arterial. Um dos componentes mais prevalentes na hipertensão tanto em humanos como em animais é a desregulação do sistema renina-angiotensina. O tecido adiposo, por si só, apresenta componente do SRA a nível local, produzindo angiotensinogênio, renina e enzima conversora de angiotensina (ECA), e em indivíduos obesos, mesmo pré-hipertensos, a concentração plasmática da ANG II está aumentada e pode participar no surgimento da hipertensão arterial.

O bloqueio periférico dos receptores AT₁ ou da produção de ANG II são importantes abordagens terapêuticas usadas no controle da pressão arterial. Tanto dados clínicos quanto experimentais demonstram que estas drogas apresentam efeitos também sobre peso corporal em pacientes hipertensos e em modelos animais. A ativação de receptores AT₁ parece estar relacionada com algumas vias celulares comuns a hormônios que regulam o metabolismo energético, como a insulina e a leptina, e esta integração já foi demonstrada em diversas regiões encefálicas, inclusive no órgão subfornical (SFO).

O SFO é um núcleo localizado na parede anterodorsal da lâmina terminal, banhado pelo terceiro ventrículo e muito próximo do plexo coróide. Este compreende um dos órgãos circumventriculares e, sendo assim, apresenta capilares fenestrados que permitem a permeação e atuação em suas células de substâncias hidrofílicas e de alto peso molecular como peptídeos diretamente da circulação sistêmica. O SFO é abundante em receptores para angiotensina do tipo 1 (AT₁) e é um dos principais sítios de ação da ANG II circulante no sistema nervoso central, especialmente para a evocação de resposta dipsogênica. Além disso, por intermédio do SFO, a ANG II é capaz de gerar resposta pressora pela ativação do sistema nervoso autônomo simpático.

O estudo de transcriptoma do SFO de ratos com privação alimentar por 48 horas mostrou um aumento da expressão de RNA mensageiro (mRNA) para receptores AT₁, indicando que o estado metabólico pode influenciar as respostas centrais à ANG II. Os principais relatos na literatura sobre a manipulação do SRA influenciando a ingestão alimentar inclui desafios de aumento da ingestão alimentar (dietas hipercalóricas e dieta de cafeteria, por exemplo), e pouco se tem relatado sobre o envolvimento deste sistema e da ANG II em condições de restrições alimentares e calóricas.

Nossa hipótese é que a ANG II possa atuar no controle integrado do balanço energético e hidromineral, e o SFO, uma importante região do SNC e rica em receptores AT₁, possa ser o local onde este controle é iniciado.

O presente trabalho tem por objetivo avaliar como a ANG II, via receptores AT₁, pode atuar no controle da ingestão alimentar e hídrica em respostas a privação de alimento, bem como, entender de que modo o estado energético pode influenciar a resposta do SFO a ANG II. Especificamente, buscamos avaliar se a concentração de glicose pode alterar, *in vitro*, a expressão dos receptores AT_{1a} e a resposta eletrofisiológica de neurônios do SFO à ANG II. Ainda, buscamos entender se existe algum fenótipo de glicossensibilidade predominante entre os neurônios do SFO que respondem a ANG II. Também, baseado nos dados de transcriptoma previamente descritos, buscamos validar se a privação alimentar é capaz de alterar a expressão de receptores AT_{1a} no SFO, e a concentração de ANG II plasmática. Por fim, objetivamos também avaliar se a ANG II e seu receptor AT₁ estão envolvidos nos comportamentos de ingestão de água e comida após privação alimentar.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O Sistema Renina Angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um sistema neuroendócrino implicado primariamente no controle hidroeletrólítico e cardiovascular, cujos principais estímulos são queda na pressão arterial, hipovolemia, diminuição na concentração de sódio plasmático e ativação β -adrenérgico (MECAWI *et al.*, 2015; SPARKS *et al.*, 2014). Suas principais respostas, além da secreção de aldosterona, incluem o aumento da pressão arterial e alterações comportamentais de ingestão de líquidos e eletrólitos, bem como a diminuição a perda de volume hídrico e de eletrólitos pela excreção urinária (ANTUNES-RODRIGUES, 2004).

O estudo deste sistema começou com a primeira descrição da relação entre a doença renal e hipertrofia ventricular, que data de 1836, sendo que, apenas em 1898, Tigerstedt e Bergman obtiveram um extrato de rim com efeito pressórico, e ao isolá-lo, chamaram-no de renina (BASSO; TERRAGNO, 2001). Em 1934, dois grupos independentes, sendo um da Argentina e outro dos Estados Unidos, demonstraram um composto secretado pelos rins capaz de causar hipertensão aguda. Este composto foi nomeado de hipertensina pelo grupo sulamericano de Braun-Menéndez, e de angiotonina pelos estadunidenses liderados por Page, até que após uma conferência em 1958 ambos concordaram a usar o nome angiotensina (BRAUN-MENENDEZ; PAGE, 1958; SMULYAN; VILLARREAL, 2019).

A via clássica deste sistema é a via periférica, e tem início com a ativação no aparelho justaglomerular para a secreção de renina, uma aspartil-protease que faz uma clivagem específica na α_2 -globulina chamada angiotensinogênio dando origem a um decapeptídeo chamado angiotensina I. Ao passar por territórios vasculares onde há a presença de uma zinco-metalopeptidase chamada enzima conversora de angiotensina (ECA), são clivados dois aminoácidos da angiotensina I, gerando o octapeptídeo angiotensina II, que é o principal efector deste sistema (SPARKS *et al.*, 2014). O principal local de produção do angiotensinogênio é o fígado, de onde provém 70% de sua concentração circulante (MULLICK *et al.*, 2017) e, um território vascular com grande expressão de ECA são vasos pulmonares (TAN *et al.*, 2018). Entretanto, outros tipos celulares também podem produzir todos os componentes deste sistema de forma local (LAVOIE; SIGMUND, 2003).

Um dos primeiros estímulos para secreção da renina se dá nos rins, envolve alguns diferentes mecanismos, podendo tanto ser pela queda de pressão nas arteríolas aferentes, como pela diminuição do conteúdo sódio circulante percebido pelas células da mácula densa (SPARKS *et al.*, 2014). Entretanto, a ativação do sistema nervoso simpático via receptores β -adrenérgicos nas células justaglomerulares também é uma importante forma de ativação do SRA (CODY, 1997). Assim, o SRA é ativado em condições de hipotensão, hipovolemia, hiponatremia e/ou aumento da atividade do sistema nervoso simpático, tendo como etapa limitante a secreção da enzima renina (TAKIMOTO-OHNISHI; MURAKAMI, 2019).

Os principais receptores do SRA são os receptores angiotensinérgicos do tipo 1 (AT_1) e tipo 2 (AT_2), além dos receptores AT_3 e AT_4 menos abundantes. Estes são receptores com sete domínios transmembrana acoplados a proteína G (MATSUSAKA; ICHIKAWA, 1997). Os receptores AT_1 , principais responsáveis pelos efeitos da ANG II, encontram-se presentes nos mais diversos tecidos. No SNC, o receptor angiotensinérgico mais comum é AT_1 , sendo encontrado mais abundantemente na lâmina terminal, núcleo paraventricular do hipotálamo,

núcleo lateral parabraquial, bulbos ventrolaterais rostral e caudal, núcleo do trato solitário e coluna intermediolateral da espinha toracolombar (MCKINLEY *et al.*, 19. 96)

Os receptores AT₁ são acoplados a proteínas G (embora também seja possível que haja ativação de receptores tirosina-quinase), dentre as quais as mais significativas são proteínas G_{q/11}, G_i, G_{α12}, G_{α13} e G_{α1} (TOUYZ; BERRY, 2002). Estas proteínas heterotriméricas são responsáveis pelos mais diversos efeitos da ANG II. A proteína G_{α1}, por exemplo, está relacionada com a ativação da fosfolipase G e produção de cGMP. Mas o principal responsável pelos efeitos mais evidentes dos receptores AT₁ é a proteína G_q, que leva a ativação da fosfolipase C (PLC, da sigla em inglês *phospholipase C*) de onde tem-se produção de 1,4,5-inositoltrifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG) a partir de fosfolídeos de membrana. IP₃ e DAG estão envolvidos na mobilização de cálcio do retículo sarcoplasmático e ativação da proteína quinase C (PKC, da sigla em inglês *protein kinase C*) (USHIO-FUKAI *et al.*, 1998). Só a mobilização de Ca²⁺ *per se* é importante para contração de musculatura lisa vascular (SIMPSON; FERGUSON, 2018). A ativação da fosfolipase A₂ (PLA₂) por sua vez, cliva fosfolídeos de membrana gerando ácido aracônico, que é substrato para geração de prostaglandinas como a H₂ (PGH₂) e tromboxano, levando a ativação do complexo do citocromo P450 e de enzimas da linhagem das quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (BONVENTRE, 1992). Ativação destas quinases, junto com outras como a própria tirosina quinase, ativam vias intracelulares responsáveis por outros diversos efeitos da ANG II como regulação do crescimento e diferenciação celular, apoptose, migração celular e deposição de matriz extracelular, ação pró-inflamatória e estímulo para secreção de outros fatores de crescimento e vasoconstritores (TOUYZ; BERRY, 2002). A ativação da MAPK, por exemplo, é comum às vias de outros hormônios como leptina (LI *et al.*, 2016) e insulina (BANKS; OWEN; ERICKSON, 2012), que são relacionados ao controle do metabolismo energético.

Os receptores AT₁ são bloqueados por bifenilimidazóis como losartana e seus derivados como telmisartana, olmesartana, etc, drogas comumente chamadas de antagonistas de receptores de angiotensina (é comum vê-los chamados de ARB, da sigla em inglês para *angiotensin receptor blockers*) (TOUYZ; BERRY, 2002). Outra classe de drogas de amplo uso comercial que atua sobre o SRA são os inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA) amplamente usada em diversos distúrbios cardiovasculares (BORGHI; ROSSI, 2015), cujo primeiro fármaco da classe foi o captopril (RUBIN; ANTONACCIO; HOROVITZ, 1978).

Os principais efeitos da ANG II são mediados pela sinalização promovida pela ativação dos receptores AT₁ e incluem: estímulo da secreção do mineralocorticoide aldosterona pela zona glomerulosa da glândula adrenal (CARPENTER; DAVIS; AYERS, 1961); ação vasoconstritora direta (YOSHIDA *et al.*, 1994); estímulo e facilitação da atividade do sistema nervoso autônomo simpático em diversos níveis, incluindo central em regiões como órgão subfornical (FERGUSON; BAINS, 1997), núcleos hipotalâmicos, como o paraventricular (FERGUSON, 1988; LI; FERGUSON, 1993b), área postrema (FINK; BRUNER; MANGIAPANE, 1987) e bulbo encefálico (ITO; SVED, 1996); secreção de vasopressina (FERGUSON; RENAUD, 1986); e estímulo do comportamento motivado para ingestão de água (EPSTEIN; FITZSIMONS; ROLLS, 1970) e sódio (BERESFORD; FITZSIMONS, 1992; MECAWI *et al.*, 2013). Todas estas ações em conjunto visam manter a volemia e a pressão arterial frente a desafios fisiológicos.

Ainda, a enzima conversora de angiotensina do tipo 2 (ECA2) pode converter ANG I e ANG II em ANG(1-7), que pode atuar tanto em receptores AT₂ como em receptores Mas, com efeitos muitas vezes antagônicos aos da ativação de AT₁ por ANG II (DOS-SANTOS *et*

al., 2017). A Figura 1 sintetiza as informações aqui apresentadas acerca da via clássica do SRA sistêmico e seus principais efeitos.

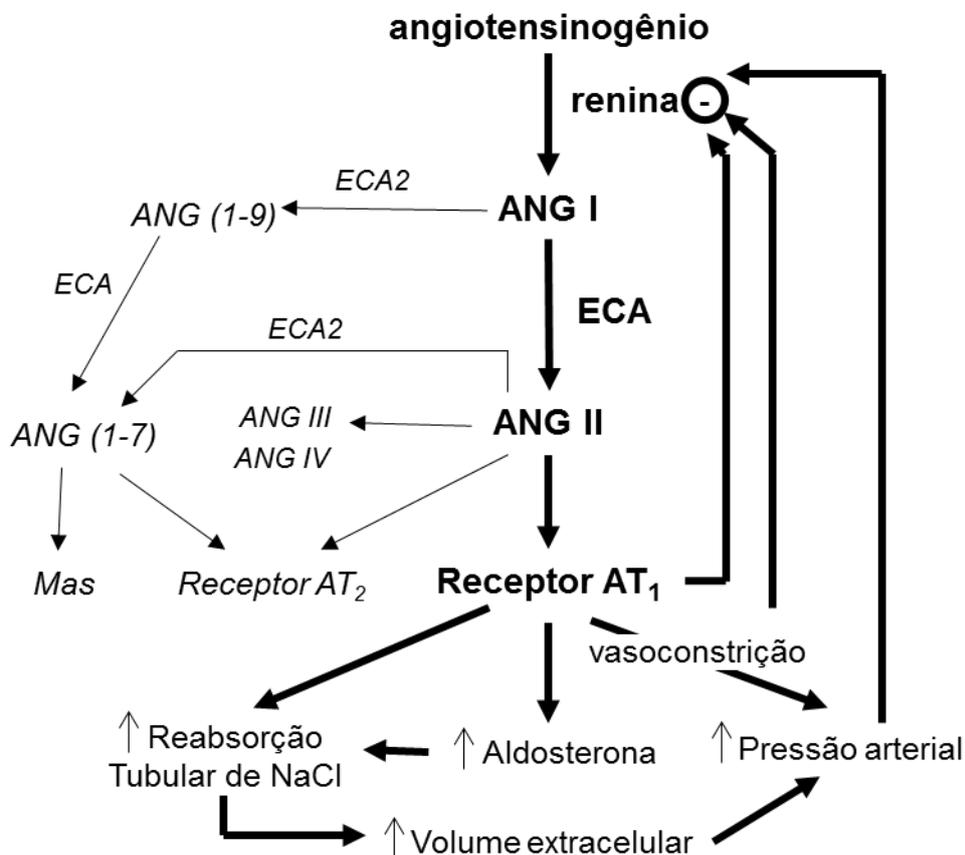


Figura 1. Visão simplificada do sistema renina-angiotensina (SRA). A figura esquemática mostra alguns componentes do SRA clássico, mostrados em negrito, enquanto os eixos mais recentes envolvendo angiotensina (1-7) e receptores Mas estão representados em itálico. Estão também resumidas algumas funções do SRA envolvendo especialmente o controle do equilíbrio hidroeletrólítico e da pressão arterial. Adaptado de Schweda (2015).

2.2. Alterações metabólicas e distúrbios cardiovasculares mediados pelo SRA

Além da proliferação de tecido adiposo, a obesidade é uma síndrome caracterizada por uma série de disfunções como hiperglicemia, elevada concentração de triglicérides, diminuição do colesterol HDL. Ao conjunto destas alterações, dá-se o nome de síndrome metabólica (KINTSCHER *et al.*, 2007).

Sinais e respostas metabólicos e cardiovasculares podem interagir tanto em situações fisiológicas como patológicas. A relação entre hipertensão e obesidade vem sendo estudada desde a década de 1960. Kannel e colaboradores (1967), no seu chamado “O Estudo de Framingham” começaram a documentar a relação entre essas duas síndromes. Desde então, a relação entre obesidade e a hipertensão tem ganhado cada vez mais importância. Inclusive, cerca de 80% dos casos de hipertensão estão relacionado à obesidade (HALL *et al.*, 2015), e o tratamento da hipertensão inclui o controle da síndrome metabólica (DEMARCO *et al.*, 2014). Esta interação também é chamada de síndrome cardiometabólica (CABANDUGAMA; GARDNER; SOWERS, 2017; MANRIQUE *et al.*, 2009).

A superatividade do SRA é um fator importante em algumas condições patológicas, especialmente hipertensão, como mostrado em diversos modelos animais e em pacientes humanos (ATKINSON *et al.*, 1980; CARRETERO *et al.*, 1971; PALS *et al.*, 1971; TONEY; PORTER, 1993; XIAO *et al.*, 2013). Assim, muitos tratamentos contra hipertensão são diretamente relacionados a atenuação da ação da angiotensina II em seu receptor AT₁ (FYHRQUIST *et al.*, 1972; WEBER, 1997). Interessante notar que em indivíduos obesos, os níveis de ANG II e de ECA estão aumentados, e seus efeitos podem estar associados com a proliferação do tecido adiposo (CASSIS *et al.*, 2008; SCHÜTTEN *et al.*, 2017). O tecido adiposo, inclusive, é o segundo maior produtor de angiotensinogênio depois do fígado (IAN PHILLIPS; SPEAKMAN; KIMURA, 1993) e é o que mais contribui para o aumento do angiotensinogênio plasmático em indivíduos obesos (BOUSTANY *et al.*, 2004). Em tempo, há receptores AT₁ no tecido adiposo (ENGELI *et al.*, 1999) e, inclusive em humanos, já é relatada síntese de aldosterona por adipócitos mediados por estes receptores (BRIONES *et al.*, 2012). A ativação crônica do SRA também pode levar a resistência insulínica, principalmente através do estresse oxidativo, ativando enzimas como óxido nítrico (NO) sintase, xantina oxidase e enzimas da cadeia respiratória mitocondrial (MANRIQUE *et al.*, 2009). A hiperinsulinemia compensatória à resistência insulínica, por sua vez, eleva a pressão arterial (LANDSBERG, 2001). A leptina, que está elevada durante a obesidade, é capaz de aumentar a atividade do sistema nervoso autônomo simpático (SNS) (HAYNES *et al.*, 1997). Assim, fatores relacionados com o balanço energético e metabólico podem se relacionar com o SRA propiciando o desenvolvimento do quadro de hipertensão arterial. A Figura 2 resume alguns destes efeitos de integração mencionados.

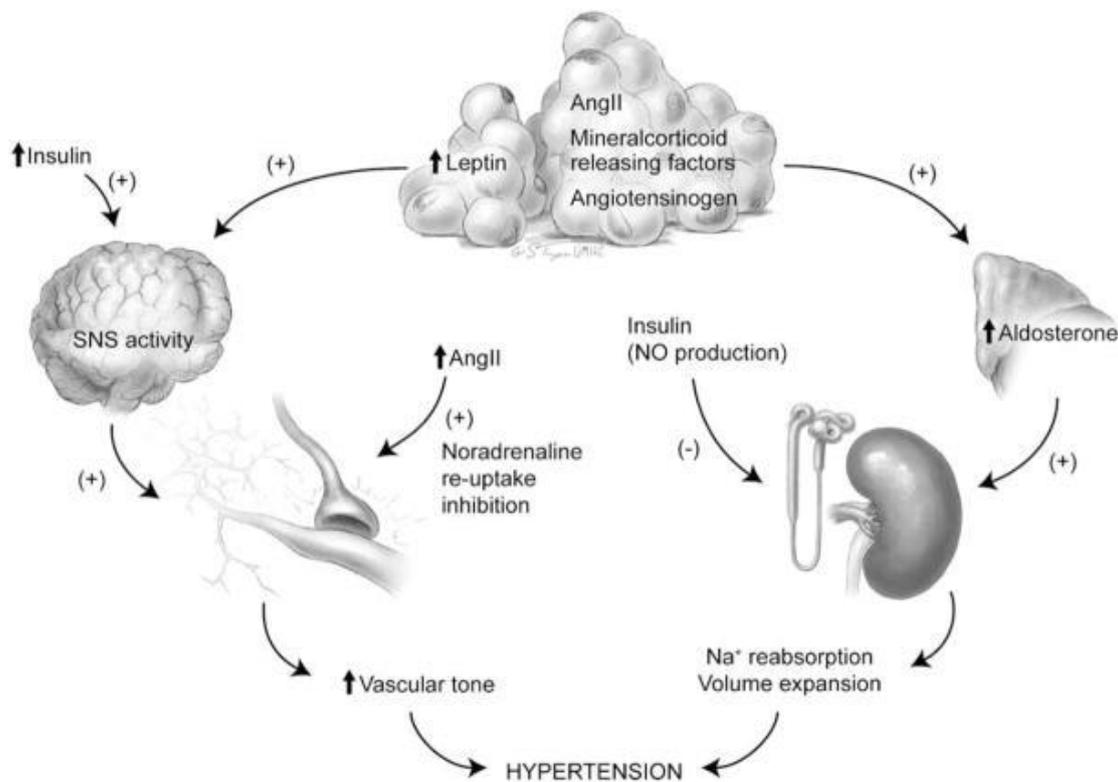


Figura 2. Integração entre obesidade, resistência insulínica e ativação do SRA e do SNS na fisiopatologia da hipertensão na síndrome metabólica. Insulin: *insulina*; SNS activity: *atividade do sistema nervoso simpático*; Vascular tone: *tônus vascular*; Noradrenaline re-uptake inhibition: *inibição da recaptação de noradrenalina*; Mineralocorticoid releasing factors: *fatores de liberação de mineralocorticoides*; Angiotensinogen: *angiotensinogênio*; Hypertension: *hipertensão*; NO production: *produção de óxido nítrico*; Na⁺ reabsorption: *Reabsorção de Na⁺*; Volume expansion: *expansão de volume*. Fonte: Manrique et al (2009).

Desde os primeiros estudos em animais com administração intracerebroventricular (i.c.v.) de ANG II sempre se observou o efeito de aumento da ingestão hídrica (EPSTEIN; FITZSIMONS; ROLLS, 1970). Entretanto, o efeito da ANG II e da manipulação farmacológica ou gênica de seu sistema no controle do balanço energético não é sempre relatado. Há descrição de perda de peso e diminuição na ingestão alimentar em animais que são tratados com infusão i.c.v. de ANG II (GRONAN; YORK, 1979; PORTER; POTRATZ, 2004). Ainda, Weisinger e colaboradores (1997), fazendo infusão central de ANG II por duas horas, mostraram que além do aumento da ingestão hídrica, há diminuição da ingestão alimentar. A infusão periférica constante de ANG II mostra diminuição no ganho de peso tanto quando feita por via intraperitoneal (CASSIS *et al.*, 2002; DIZ; BAER; NASJLETTI, 1983; MUTHALIF *et al.*, 2000) quanto por via subcutânea (BRINK *et al.*, 2001; BRINK; WELLEN; DELAFONTAINE, 1996; CASSIS *et al.*, 1998), acompanhado, muitas vezes por aumento da ingestão hídrica e diminuição da ingestão alimentar. Em camundongos, o efeito anorexigênico também é observado com angiotensina II i.c.v. *in bolus* (NAKANO-TATENO *et al.*, 2012; OHINATA *et al.*, 2008) ou infusão contínua (YOSHIDA *et al.*, 2012), sendo que neste último caso, houve também diminuição do peso corporal.

Como esperado, drogas que inibem a síntese da ANG II ou sua ação nos receptores AT₁ também influenciam o metabolismo energético. Inibidores da ECA, como o captopril, enalapril ou perindopril, são capazes de diminuir a ingestão alimentar e peso corporal em diversas condições alimentares tanto em ratos (DE KLOET *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2008; WEISINGER *et al.*, 2008) como em camundongos (PREMARATNA *et al.*, 2012; WEISINGER *et al.*, 2009). Um possível efeito proposto é que o bloqueio da ECA periférica aumenta a concentração de angiotensina II central (DE KLOET *et al.*, 2009). Entretanto, antagonistas do receptor AT₁ também tem efeitos anorexigênicos e de diminuição do peso corporal semelhante ao da própria angiotensina II, sendo inclusive apontados com um possível papel na prevenção da obesidade (WEISINGER; BEGG; JOIS, 2009). Losartana e outros antagonistas AT₁ demonstraram efeitos de redução da ingestão alimentar e do ganho de peso em condições de dietas hipercalóricas (MACHADO *et al.*, 2012; MIESEL *et al.*, 2012; SAGAE *et al.*, 2013; SHARIEH HOSSEINI; KHATAMSAZ; SHARIATI, 2014; SMITH *et al.*, 2014). A telmisartana também previne o ganho de peso em ratos submetidos à dieta de cafeteria (MÜLLER-FIELITZ *et al.*, 2015) e tem efeitos antiobesidade em linhagem de linhagem de ratos obesos (MÜLLER-FIELITZ *et al.*, 2014). Quando associados a inibidores da ECA, o bloqueio dos receptores AT₁ levam a diminuição do ganho de peso, mas sem efeito adicional de um tratamento ao outro (MIESEL *et al.*, 2012). Estes efeitos de bloqueio AT₁ não são restritos apenas a modelos animais, mas também ocorrem em humanos (KINTSCHER *et al.*, 2007).

2.3. O órgão subfornical como integrador central de sinais periféricos

O sistema nervoso central (SNC) coordena as respostas de todo o organismo animal, e por isso mesmo, precisa de um sistema de proteção contra possíveis agentes lesivos e infecciosos que possam afetar o seu funcionamento. A principal barreira física do SNC contra moléculas lesivas e agentes patológicos circulantes é a barreira hematoencefálica (BHE). Este é o termo usado para designar uma série de propriedades da microvasculatura do SNC como: vasos contínuos de membrana basal completa que apresentam características adicionais como junções comunicantes estreitas, células murais e astrócitos, adicionando ainda mais restrições

para patógenos, agentes inflamatórios e toxinas (DANEMAN; PRAT, 2015). Este é um mecanismo de proteção importantíssimo, mas confere algumas restrições na integração do SNC com as pistas hidrominerais, metabólicas, cardiovasculares, imunológicas e endócrinas circulantes do *milieu interieur*, impedindo que alterações de osmolaridade, glicose, cálcio, sódio, aminoácidos hidrofílicos e peptídeos sejam percebidas na maior parte do SNC (FERGUSON, 2014).

No entanto, nem todo SNC encontra-se isolado pela BHE. Algumas áreas encefálicas que circundam os ventrículos cerebrais não possuem BHE e foram chamados de “órgãos circunventriculares” (OCV), primeiramente por Hofer (HOFER, 1958 *apud* MIYATA, 2015). Hoje, algumas estruturas são classificadas como tais podendo ser divididas em OCVs secretórios como neuro-hipófise, eminência média e pineal e OCVs sensoriais, como o órgão vascular da lâmina terminal (OVLT), a área postrema e o órgão subfornical (SFO, do termo em inglês *subfornical organ*) (MIYATA, 2015).

O SFO é um OCV sensorial localizado na parede anterodorsal do terceiro ventrículo, dorsal à comissura anterior, cujas funções incluem ações bem estabelecidas na regulação neuroendócrina de diversos sistemas fisiológicos e respostas comportamentais (MIMEE; SMITH; FERGUSON, 2013). O SFO consiste em uma estrutura ovoide na linha central do eixo mediano, que se projeta para o lúmen do terceiro ventrículo cerebral ao nível de forâmen interventricular. Esta estrutura se origina da parede endimária do telencéfalo, da porção dorsal da placa comissural até o ponto de origem do plexo coroide telencefálico. Morfologicamente é composto pelo pericário dos neurônios e seus dendritos e axônios, dendritos e axônios provenientes de outras regiões encefálicas, células microgliais, endimárias e tanicitos, neurônios supra endimais, e um rico suprimento vascular (DELLMANN; SIMPSON, 1979). O SFO apresenta conexões com as mais diversas áreas do SNC, incluindo núcleo mediano pré-óptico, septo medial, órgão vascular da lâmina terminal (OVLT), e núcleos hipotalâmicos como o supra-óptico, o supraquiasmático e o paraventricular (PVN, da sigla em inglês para *paraventricular nucleus*) (LIND; VAN HOESEN; JOHNSON, 1982).

A estimulação elétrica do SFO leva ao comportamento de ingestão de água (SMITH; BENINGER; FERGUSON, 1995), enquanto lesões no SFO inibem a resposta da angiotensina II periférica em provocar o comportamento motivado de ingestão por água (THRASHER; SIMPSON; RAMSAY, 1982). Ainda, tanto a estimulação elétrica do SFO (FERGUSON; DAY; RENAUD, 1984), como a estimulação de receptores AT₁ pela ANG II são capazes de elevar a pressão arterial via PVN (COBLE *et al.*, 2015), mostrando a participação deste núcleo no controle cardiovascular. Integrando estas funções hidromineral e cardiovascular, o SFO leva a secreção de hormônios neuro-hipofisários (FERGUSON; RENAUD, 1986) envolvidos tanto no controle da pressão arterial como no equilíbrio hidroeletrolítico, como vasopressina (FERGUSON; KASTING, 1986) e ocitocina (FERGUSON; KASTING, 1987) por intermédio de ANG II (FERGUSON; KASTING, 1988). Ainda que não muito abordado, ao ser estimulado, o SFO é capaz de elevar o comportamento motivado de ingestão alimentar (SMITH; ROZANSKI; FERGUSON, 2010), e isso pode ser devido a projeções do SFO a regiões relacionadas com fome, como o núcleo arqueado (ROSAS-ARELLANO; SOLANO-FLORES; CIRIELLO, 1993).

Assim, pelas suas características e localização, o SFO pode responder a diversos estímulos circulantes, e pode integrar estas respostas de diferentes naturezas. O SFO é rico em receptores AT₁, sendo um importante alvo da ANG II circulante, que naturalmente não atravessa a BHE devido a suas características moleculares (SIMPSON; ROUTHENBERG, 1973; XU; XINGHONG, 1999), sendo a resposta eletrofisiológica dos neurônios do SFO a

ANG II, quando responsivos, sempre no sentido da despolarização (CANCELLIERE; FERGUSON, 2017; FERGUSON *et al.*, 1997; SIMPSON; FERGUSON, 2017). Sinais metabólicos também podem atuar sobre o SFO, como a leptina, (SMITH *et al.*, 2009), adiponectina (ALIM *et al.*, 2010), amilina (PULMAN, 2006; RIEDIGER; RAUCH; SCHMID, 1999), e peptídeos de origem de células endócrinas gastrointestinais como ghrelina (TAKAYAMA *et al.*, 2007), e colecistocinina (CANCELLIERE; FERGUSON, 2017). Os neurônios do SFO também podem responder a alterações da glicemia, sendo a metade destes neurônios classificados como glicossensíveis. Destes, metade responde como glicoexcitáveis (GE) e metade como glicoinibidos (GI), e o mecanismo de ação sobre esta glicossensibilidade permanece ainda incerto (MEDEIROS; DAI; FERGUSON, 2012). Ora, se o SFO é capaz de receber informações metabólicas, cardiovasculares e hidroeletrólíticas, não poderia este ser um local de integração entre estes estímulos? Também é descrito que a resposta de neurônios do SFO à ANG II varia de acordo com a concentração de glicose onde estas células são incubadas e registradas, sendo que quanto maior a concentração de glicose, maior a proporção de neurônios que respondem a ANG II (CANCELLIERE; FERGUSON, 2017), o que reforça que a ANG II no SFO pode sofrer influência do estado energético do organismo. Por fim, estudos de transcriptoma do SFO de ratos em privação alimentar de 48h indicam o aumento da expressão de RNA mensageiro para AT₁ (HINDMARCH *et al.*, 2008). O significado desta alteração na expressão do receptor foi a base de algumas das perguntas da presente tese.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

O presente trabalho tem por objetivo avaliar como a ANG II, via receptores AT₁, pode atuar no controle da ingestão alimentar e hídrica em respostas a privação de alimento, bem como, entender de que modo o estado energético pode influenciar a resposta do SFO a ANG II.

Objetivos específicos:

- Avaliar se a concentração de glicose pode alterar, *in vitro*, a expressão dos receptores AT_{1a} e a resposta eletrofisiológica de neurônios do SFO à ANG II.
- Avaliar se há algum fenótipo de glicossensibilidade predominante entre os neurônios do SFO que respondem a ANG II.
- Avaliar se a privação alimentar é capaz de alterar a expressão de receptores AT_{1a} no SFO, e a concentração de ANG II plasmática.
- Avaliar se a ANG II e seu receptor AT₁, central e periféricamente, estão envolvidos nos comportamentos de ingestão de água e comida após privação alimentar.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais e apreciação ética de seu uso

Os experimentos realizados no Canadá (experimentos de eletrofisiologia e incubação de células do SFO em diferentes concentrações de glicose dos protocolos I e II) usaram ratos Sprague-Dawley machos (Charles River, Québec, Canadá) seguindo as diretrizes do Canadian Council on Animal Care e aprovados pelo Queen's University Animal Care Committee at Queen's University (Kingston, ON, Canadá), sob número de protocolo 2017/1735. Já os experimentos realizados no Brasil, dos protocolos III, IV e V, usaram ratos Wistar machos (provenientes do Biotério Central da USP de Ribeirão Preto ou do Biotério de Criação do Departamento de Ciências Fisiológicas do ICBS/UFRRJ), e os procedimentos foram submetidos e aprovados pela CEUA da FMRP-USP sob o protocolo 229/18. Em todos os casos, os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12h (6:00 e 18:00), temperatura controlada ($22\pm 2^\circ\text{C}$) com comida (ração peletizada para roedor) e água *ad libitum*.

4.2. Protocolos Experimentais

O presente trabalho foi realizado em alguns protocolos experimentais distintos a fim de responder às questões propostas para elucidar a participação dos receptores AT_1 no balanço energético. Os experimentos realizados são os abaixo descritos:

Experimento I. Efeito da concentração de glicose sobre a expressão dos receptores AT_{1a} em cultura de células dissociadas do SFO

Para avaliar se neurônios mantidos em diferentes concentrações de glicose apresentariam diferenças na expressão de receptores AT_{1a} , foram realizados experimentos de cultura celular de células dissociadas do SFO, incubados em diferentes concentrações de glicose (1mM, 5mM e 10mM) por diferentes períodos de tempo (1h, 6h e 24h) para avaliação da expressão de mRNA para o receptor AT_1 .

Experimento II. Caracterização eletrofisiológica de neurônios isolados do SFO responsivos a ANG II quanto a sensibilidade a glicose

Com o objetivo de determinar se os neurônios que respondem a ANG II pertencem a algum fenótipo de glicossensibilidade específico, fizemos estudos eletrofisiológicos com a técnica de *patch-clamp* em neurônios dissociados isolados do SFO na configuração de *perforated patch*. Os neurônios eram testados para ANG II, alterando a concentração de glicose do meio, eram classificados como GE, GI ou nGS. Também foi testado se um mesmo neurônio altera sua resposta a ANG II dependendo da concentração de glicose na qual está sendo registrado, a fim de se avaliar se a glicemia poderia alterar a resposta destes neurônios à ANG II.

Experimento III. Efeito da privação alimentar no sistema renina-angiotensina periférico e expressão de receptores AT_{1a} no SFO

Este protocolo teve o objetivo de avaliar a concentração plasmática de ANG I, ANG II, vasopressina e corticosterona, além da expressão gênica dos receptores AT_{1a} no SFO após a privação alimentar. Para tal, ratos Wistar machos adultos ($220,7\pm 4,974\text{g}$; $n=27$) foram divididos em três grupos ($n=9/\text{grupo}$) e alocados em caixas coletivas com livre acesso à ração e água, com peso corporal acompanhado diariamente. Primeiramente foi retirada a ração dos animais que ficariam 48h em jejum, e, depois de um dia, foi retirada a ração do grupo 24h de

jejum. No dia seguinte, todos os animais foram submetidos a eutanásia por decapitação no período da manhã (das 8:00 às 11:00) para coleta de sangue com inibidores de peptidases para determinação de ANG I e II plasmáticos e em heparina para hematócrito e coleta de plasma para mensuração de sódio plasmático, vasopressina e corticosterona. Os encéfalos foram coletados e conservados a -80°C em condições livres de RNase para posterior procedimento de *micropunch* do órgão subfornical para ensaio de RT-qPCR.

Experimento IV. Efeito do bloqueio periférico de receptores AT₁ na ingestão alimentar e hídrica após privação alimentar

Este protocolo teve por objetivo avaliar se o bloqueio de receptores AT₁ por losartana seria capaz de alterar peso corporal, volume urinário, glicemia, hematócrito, concentração plasmática de sódio e ingestão de água em condições de privação alimentar. Para tal, ratos Wistar ($331,6 \pm 7,134\text{g}$, $n=24$) foram divididos em 4 grupos ($n=6/\text{grupo}$), os com acesso a água ou losartana em baixas concentrações como única fonte de fluidos, mantidos com acesso a comida ou em privação alimentar de 48h (Água/Ração, Água/Jejum, LOS/Ração, LOS/Jejum, $n=6$ por grupo). Os animais foram privados ou não por 48h nas gaiolas metabólicas recebendo água ou losartana de acordo com o grupo e, parte dos animais foi submetida a eutanásia antes da reapresentação ($n=6$ por grupo) para coleta de sangue para hematócrito e dosagem sódio plasmático. Outros animais ($n=6$ por grupo) foram avaliados durante o jejum e após a reapresentação de ração, sendo então acompanhado a ingestão de fluidos e ração, peso corporal e volume urinário por até 12 horas.

Experimento V. Efeito da administração de angiotensina II e losartana intracerebroventricular em condições basais e após privação alimentar

Para avaliar se a manipulação central aguda do SRA afeta a ingestão alimentar de animais em condições basais e após 48h de privação alimentar, ratos Wistar machos ($319,5 \pm 4,88\text{g}$; $n=37$) foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implante de cânula-guia no ventrículo lateral. Uma vez recuperados da cirurgia, os animais foram alocados em gaiolas metabólicas, adaptados e foi avaliada a ingestão de água e ração e peso corporal após a administração central de veículo (NaCl 0,9%, grupo controle), ANG II ou losartana. Os animais foram então privados por 48h de ração e avaliou-se novamente a ingestão de água e ração e peso corporal após a administração central de veículo, ANG II e losartana e reapresentação de ração.

4.3. Experimento I: Efeito da concentração de glicose sobre a expressão dos receptores AT_{1a} em cultura de células dissociadas do SFO

4.3.1. Preparação de neurônios do SFO

As culturas de células do SFO foram obtidas com descrito anteriormente por Ferguson e colaboradores (1997). Ratos Sprague-Dawley machos (100-175g) foram decapitados sem anestesia prévia e tiveram seus encéfalos coletadas e imediatamente colocados em líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF, do inglês *artificial cerebrospinal fluid*) contendo (em mM) NaCl 124, KCl 2,5, MgSO₄ 1,3, KH₂PO₄ 1,24, NaHCO₃ 20, glicose 10 e CaCl₂ 2,27, oxigenado e gelado a temperatura de gelo. Um bloco contendo a comissura hipocampal foi separado e o SFO era dissecado do tecido adjacente, e imediatamente levado a uma gota de meio Hibernate-A (Thermo Fisher Scientific) suplementado com B27 (GIBCO, Gaithersburg,

MD, EUA). Para cada dissociação, seis a nove animais foram usados e tiveram seus SFO coletados e transferidos para uma solução contendo 10-16mg de papaína liofilizada (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, EUA) dissolvido em 5mL de Hibernate-A a 37°C para dissociação enzimática das células. Depois de 30 minutos, a solução de papaína foi lavada duas vezes com a solução Hibernate-A/B27 para remoção da enzima. Os SFOs foram então submetidos a três ciclos de trituração, em uma etapa de dissociação mecânica, que consistia em fluxos turbulentos com uma pipeta de 1mL para causar o afastamento dos neurônios um dos outros e de outras células como a glia. Os tubos contendo as células eram centrifugados a 100 G por oito minutos e o sobrenadante era descartado. O *pellet* era ressuspenso em solução de Neurobasal-A suplementado com B-27, 227 µM de piruvato de sódio, 100 U/mL de penicilina-estreptomicina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), e glicose a 1mM, 5mM ou 10mM, dependendo do protocolo.

4.3.2. Incubação de células do SFO e protocolo geral de RT-qPCR

Os neurônios foram incubados em tubos *eppendorfs* de 1,5mL abertos em diferentes concentrações de glicose (1mM, 5mM e 10mM) a 37°C e 5% CO₂. Decorrido o tempo de incubação de cada um dos grupos (1h, 6h e 24h), os tubos eram retirados da incubadora e levados para congelamento a -80°C. Assim, obteve-se amostras de células cultivadas em três diferentes concentrações de glicose por três períodos de tempo distintos. No momento da extração de mRNA as amostras foram descongeladas e mecanicamente homogeneizadas com 1 mL de solução de QIAzol Lysis e deixados a temperatura ambiente por cinco minutos antes de serem submetidos à centrifugação (15 minutos a 10.000g a 4°C), e, a partir daí, seguiam os protocolos de extração em colunas do *kit* RNeasy e de síntese de cDNA descrito no tópico 3.5.1. As sondas usadas foram para β-Actina (Rn00667869_m1) e para AT_{1a} (Rn01435427_m1).

4.4. Experimento II: Caracterização eletrofisiológica de neurônios isolados do SFO responsivos a ANG II quanto a sensibilidade a glicose

4.4.1. Preparação de neurônios do SFO

Ratos Sprague-Dawley (100-175g) foram decapitados sem anestesia prévia e tiveram o SFO coletado e dissociado como descrito no tópico de preparação de neurônios do SFO (4.3.1). Entretanto, neste caso, foram usados três animais por *pool* em cada experimento. A dissociação seguia igual ao que fora anteriormente citado até os *pellets* serem ressuspenso. A solução com as células dissociadas era então aliquoteada em placas Corning de base plástica (Sigma, St Louis, MO, EUA) a baixa densidade (~10 células/mm²) para garantir que não fossem formados contatos sinápticos entre as células, e eram incubadas por 1,5 a 2 horas [incubador (Forma Scientific, Marietta, OH) mantido a 37°C e 5% CO₂ misturado com ar ambiente] para permitir às células aderirem ao fundo da placa. Em seguida, 2mL da solução de Neurobasal-A (como descrita anteriormente, com concentração de glicose a 1mM, 5mM ou 10mM) era adicionado em cada placa, que era mantida em cultura por um mínimo de 24 horas antes do uso. As células foram mantidas por até seis dias na incubadora, com solução de Neurobasal-A renovada a cada 48h a 72h.

4.4.2. Eletrofisiologia

Registros de neurônios do SFO foram obtidos usando amplificador de *patch clamp* Multiclamp 700B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). Parâmetros de estímulo e registro foram controlados pelos softwares Spike 2 (versão 8.01) e Signal (versão 6.01) (Cambridge Electronics Design, Cambridge, UK). Dados foram obtidos a 10Hz, filtrados a 2Hz e digitalizados usando interface Micro1401 (Cambridge Electronic Design). Anfotericina B (Sigma-Aldrich) foi usado como agente perfurante, de acordo com protocolo previamente descrito (CANCELLIERE; FERGUSON, 2017). O agente antifúngico era diluído em DMSO (20 μ L de DMSO a 2% por mg de anfotericina B), agitado em vórtex por 2 minutos e estocado a -20°C por um período de no máximo 72h. Aproximadamente 8-10 μ L de solução de anfotericina B era descongelada e adicionada a solução interna de pipeta, agitado por vórtex e sonificador. Uma nova solução de pipeta com anfotericina B (concentração final de 400 μ L/mL) era preparada a cada 2-3 horas imediatamente antes do registro. A solução interna de pipeta continha o seguinte (em mM) gluconato de potássio (C₆H₁₁KO₇) 125, KCl 10, MgCl₂ 2, HEPES 10, EGTA 1, CaCl₂ 0,3 e NaATP 2, a pH 7.2 com KOH, esterilizado por filtração a 0,22 μ m, e estocado a -80°C (faixa de osmolaridade aceitável: 280-300mmol/kg). As pipetas foram feitas com vidro borossilicato (World Precision Instruments, Sarasota, FL, EUA) em um puxador de micropipetas Flaming Brown (modelo P97; Sutter Instrument, Novato, CA, USA), e tinham resistência de 2,5-5 M Ω quando cheios com solução interna e tocando o banho. A solução externa usada para o registro continha (em mM): NaCl 140, KCl 5, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1 e HEPES 10 a pH 7,2 com NaOH. A concentração de glicose da solução externa dependia do protocolo usado. Para solução externa com glicose a 5mM, 5mM de manitol era adicionado para compensar a diferença na osmolaridade (faixa de osmolaridade aceitável: 280-300mosm/L). As placas com as células eram perfundidas com a solução extracelular por gravidade em um sistema aquecido (37°C) num fluxo de 1 a 3 mL/min e o fluido era removido via bomba de vácuo. Antes do registro, a ponta da pipeta era mergulhada na solução interna por aproximadamente meio segundo e depois preenchido com 8 μ L de solução interna com anfotericina B. Usando um micromanipulador MP-225 (Sutter Instruments), a pipeta era abaixada no banho em uma célula selecionada por suas características morfológicas. Uma vez que era feito um contato com a membrana, uma leve pressão negativa era aplicada no intuito de atingir um selo com resistência acima de 1 G Ω , e depois aguardava-se de 30 a 40min para a anfotericina B formar poros na membrana até a que resistência estabilizasse. Capacitância e resistência em série eram compensadas antes do registro. Células eram identificadas como neurônios quando correntes de sódio de ativação e inativação rápidas (I_{Na}) podiam ser encontradas após aplicação de *voltage steps* no modo de *voltage-clamp*. Neurônios que não apresentassem potenciais de ação \geq 50mV, seja espontaneamente ou evocada por injeção de corrente, quando na configuração *current-clamp*, não eram consideradas para análise. Uma corrente de -15,7mV era somada ao potencial de membrana (V_m) reportado pelo sistema de registro para correção dos valores de acordo com o que fora previamente calculado para o equipamento. Era aguardado um mínimo 5 minutos de registro estável para controle antes de iniciar os protocolos.

Os registros eletrofisiológicos iniciais eram obtidos de células incubadas e inicialmente registradas a 10mM de glicose, com aferição da glicossensibilidade sendo feita com a diminuição da concentração de glicose no meio para 5mM por 300 a 500 segundos. Escolhemos iniciar neste protocolo porque já era sabido que nesta concentração temos uma maior proporção de neurônios responsivos a ANG II (CANCELLIERE; FERGUSON, 2017). Neurônios que respondiam com hiperpolarização a redução da glicose de 10 para 5 mM eram

classificados como glicoexcitáveis (GE), os que respondiam com despolarização eram classificados como glicoinibidos (GI) e as células onde a alteração da glicose não levava a alterações no V_m eram classificadas como não-glicossensíveis (nGS), como previamente mostrada por Medeiros *et al.* (2012). Depois da classificação quanto a resposta à glicose, para avaliar a resposta a ANG II, era perfundido ANG II no banho à concentração de 10nM, em um volume aproximado de 2mL. Um segundo conjunto de experimentos foi obtido em células incubadas e inicialmente registradas a 5mM e depois mudadas para 10mM de glicose, com as células que despolarizavam sendo classificadas como GE, as que hiperpolarizavam como GI, e as que não respondiam como nGS.

Por fim, nós avaliamos as respostas a ANG II em duas diferentes concentrações de glicose em um mesmo neurônio. Para este experimento, todas as células eram incubadas com 5mM de glicose e inicialmente registradas a 5mM glicose e 10nM de ANG II conforme descrito nos últimos protocolos. Pelo menos 300s depois de os neurônios se recuperarem da administração de ANG II, a concentração de glicose do banho era mudada para 10mM e, depois do potencial de membrana estabilizar, ANG II era aplicada novamente também a 10nM. Após o final da resposta, a concentração de glicose do banho era mudada de volta para 5mM e era observado se a célula retornou a seu potencial de membrana basal. Em todos os protocolos, a ANG II era reconstituída na solução de registro (aCSF) com a mesma concentração de glicose na qual seria testada.

A caracterização da resposta de cada neurônio seguiu os critérios descritos anteriormente por (MEDEIROS; DAI; FERGUSON, 2012). Segmentos representativos de 100s do registro eram selecionados do basal e após a aplicação de ANG e/ou da alteração da concentração de glicose, e o V_m médio foi calculado usando *script* no software Spike 2. Eram consideradas respostas quando a média dos grupos de 100s após aplicação de ANG II ou alteração da concentração de glicose foram maiores que duas vezes o desvio padrão do basal. Quando, eventualmente, uma célula registrada apresentava um desvio padrão muito grande devido a uma alta atividade de potencial de membrana, com muitos potenciais de ação, por exemplo, uma alteração >75% na frequência de disparo de potenciais de ação foram consideradas para classificar a resposta da célula.

4.5. Experimento III: Efeito da privação alimentar no sistema renina-angiotensina periférico e expressão de receptores AT_{1a} no SFO

4.5.1. Extração de RNA e síntese de cDNA para RT-qPCR

Os cérebros eram cortados em fatias de 60 μ m à baixa temperatura (-20°C) por um criostato, e o SFO era coletado por microdissecção com agulhas de *punch* (de 8 cortes a partir do início da estrutura), e então armazenados a -80° C em solução de 1mL do reagente QIAzol Lysis (Qiagen) após agitação por vórtex. Para extração de mRNA, as amostras eram deixadas para descongelar em gelo (~4°C) e então novamente agitadas mecanicamente em vórtex. Era acrescentado clorofórmio às amostras para extração e estas eram agitadas vigorosamente e deixadas à temperatura ambiente por cinco minutos antes de ser submetidos à centrifugação (15min, 12.000G, 4°C). Eram formadas três fases e o sobrenadante contendo RNA era então transferida para uma coluna de centrifugação (*spin column*, do kit RNeasy), evitando interfase, e precipitado com 1 volume de etanol (70% col/col), seguido por digestão por

DNase com *DNase set* (Qiagen) para eliminar contaminação com DNA genômico, e foi purificado usando o conjunto RNeasy Mini Kit (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante. A síntese de cDNA foi feita usando QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen). Real-time PCR (qPCR) foi realizado em triplicata com TaqMan Universal PCR Master Mix kit (Invitrogen) e as sondas usadas foram para β -Actina (Rn00667869_m1) com controle endógeno e para AT_{1a} (Rn01435427_m1) da Thermo Fisher Scientific. As reações foram realizadas usando um QuantStudio 3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para quantificação relativa da expressão gênica foi usado o método $2^{\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4.5.2. Radioimunoensaio para dosagem hormonal

Na eutanásia por decapitação, sangue era coletado diretamente do tronco do animal em tubos do tipo Falcon contendo heparina ou inibidores de peptidase [PMSF (17,42mg/100mL), EDTA (10%), pepstatina (0,5mM), fenantrolina (30mM), na proporção de 10 μ L, 10 μ L, 10 μ L e 50 μ L por mililitro de sangue coletado] para determinação das concentrações plasmáticas de respectivamente vasopressina e corticosterona, e ANG I e II. O sangue foi centrifugado por 2000rpm a 4°C por 15 minutos para separação do plasma. O plasma foi transferido para tubos de ensaio que foram armazenados em temperatura de congelamento (~ -10°C) até o momento da extração.

Vasopressina (AVP) foi extraída do plasma com acetona e éter de petróleo. Transferiu-se 1mL de plasma para um tubo contendo 2mL de acetona gelada (Merck, Brasil), seguido por agitação de 30 segundos e centrifugação (2500rpm, 25min, 4°C). A seguir, o sobrenadante foi transferido para um tubo contendo 3 mL de éter de petróleo (Reagen, Brasil), sendo submetido a agitação e reservado durante 2 min. O sobrenadante (éter de petróleo) foi desprezado por aspiração e o líquido restante (acetona) contendo a AVP foi submetido ao processo de liofilização. A extração de corticosterona se deu a partir da pipetagem de 25 μ L de plasma em 1mL de álcool absoluto frio e agitados em vórtex por 1 min. O tubo foi centrifugado (2500 rpm, 15min, 4°C) e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, que então foi liofilizado. Por fim, para extração dos peptídeos angiotensinérgicos, 1mL de plasma era transferido para tubos de ensaio de 5mL. Era adicionado 2mL de ácido trifluoroacético 0,1% (0,1% TFA) nos tubos e agitado em vórtex por 30 segundos. Depois era centrifugado (2500 rpm, 15 min, 4°C), seguia-se a ativação da coluna de purificação (tipo Strata C18-E) com adição de 4mL de acetonitrila a 60% à coluna e posterior lavagem com 20mL de 0,1% TFA. O sobrenadante (~2-3 mL) advindo da centrifugação da amostra era transferido para a coluna. Partia-se para a segunda lavagem adicionando 20mL de 0,1% TFA na coluna. Transferia-se a coluna para um novo tubo de ensaio de 5mL com adição de 3mL de acetonitrila a 60% na coluna. As amostras foram liofilizadas por fim. Em todos os casos, após a liofilização, as amostras foram armazenadas a -20°C até o ensaio.

No momento do ensaio, os produtos liofilizados foram ressuspensos em tampão do ensaio nos volumes de 250 μ L para AVP, 1,5mL para corticosterona e 400 μ L para as angiotensinas. Todas as etapas do processo de extração foram realizadas sobre gelo. Para determinar a eficiência da extração dos hormônios pelos métodos utilizados, uma quantidade de aproximadamente 25.000cpm do peptídeo marcado (com 125I) foi adicionada a 1mL de plasma, o qual foi submetido às extrações, como descrito acima. Os sobrenadantes e os precipitados, gerados em cada uma das etapas da extração, foram analisados no contador gama e, a partir dos valores de suas radioatividades obtidas, foi calculada a proporção do

hormônio recuperado no final do processo de extração. A extração foi considerada eficiente quando a porcentagem de recuperação do hormônio marcado foi acima de 90%.

Todas as dosagens hormonais foram realizadas através de radioimunoensaios específicos usando as técnicas descritas por Robertson *et al.* (1973), Castro *et al.* (1995) e Botelho *et al.* (1994) para, respectivamente, AVP, corticosterona e ANG I e II. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. A sensibilidade do ensaio e o coeficiente de variação intra- e interensaio foram: 1,2 pg/mL, 12,2 e 15,2% para ANG I; 0,5 pg/mL, 14,9% e 27,1% para ANG II; 0,8 pg/mL, 7,7% e 11,9% para AVP; 0,4 µg/dL, 5,1% e 8,4% para corticosterona.

4.6. Experimento IV: Efeito da privação alimentar no sistema renina-angiotensina periférico e expressão de receptores AT_{1a} no SFO

4.6.1. Preparo da solução de losartana na água de beber

Losartana potássica (Sigma-Aldrich) era diluída em água filtrada na concentração de 70mg/L e 35mg/L, para ser ofertada como única fonte de fluidos para os animais dos grupos losartana. A fim de se conseguir uma ingestão de concentração próxima a 5mg/kg/dia para provocar o bloqueio de receptores AT₁ do SFO sem causar alterações cardiovasculares como foi visto anteriormente (PORCARI *et al.*, 2019) foi-se oferecido a solução de 35mg/L para os animais com acesso à ração e 70mg/L para os que foram privados de ração, visto que estes tem uma ingestão menor de fluidos.

4.6.2. Comportamento ingestivo em gaiola metabólica

Os animais foram alocados individualmente em gaiolas metabólicas nas quais foram adaptados por um período de 4 dias, com livre acesso a água, oferecida em buretas graduadas, e ração comercial moída. Ao final do período de aclimatação, às 18:00 os animais dos grupos losartana tiveram suas buretas de água mudadas exclusivamente para losartana, e os animais dos grupos jejum tiveram a ração retirada. Os animais foram pesados, os coletores de urina foram zerados e foi feita a mensuração da glicemia de sangue periférico da ponta da cauda com aparelho portátil AccuCheck Performa (Roché Diagnostics, Mannheim, Alemanha) no início da fase clara (07:00). Após 24 horas do início do experimento foram feitas as medidas da ingestão alimentar e de fluidos, peso corporal, glicemia e volume urinário com coleta de amostra de urina. Ao final das 48h de privação alimentar, as mesmas mensurações foram feitas e houve a reapresentação de ração para os grupos jejum, nos quais avaliou-se a ingestão alimentar e de fluidos a partir das 18:00 após 30, 60, 120, 180 e 240 minutos, e na manhã seguinte, após 12 horas. Também os animais foram pesados após 4 e 12 horas após a reapresentação, assim como o volume urinário foi medido e amostra de urina coletada. Ingestão alimentar e de fluidos e excreção urinária foram padronizados por 100g de peso corporal (PC) baseado na pesagem mais recente, sendo representadas respectivamente como g/100g e mL/100g para as duas últimas medidas.

4.6.3. Hematócrito

Amostras de hematócritos eram coletados em tubos específicos por capilaridade a partir do sangue total com heparina previamente coletado e centrifugados a 1000rpm por 5 minutos. A proporção entre a coluna celular contra o conteúdo total (plasma e volume corpuscular de hemácias) foi o valor de hematócrito (descrito em porcentagem - %).

4.6.4. Sódio plasmático

A concentração plasmática de sódio foi dada a partir de avaliação através de fotômetro de chama (MICRONAL, modelo b262, Piracicaba, SP, Brasil). A fotometria de chama é uma técnica de espectroscopia atômica, onde a amostra analisada é aquecida e vaporizada por uma chama, liberando energia e luz, a ser registrada pelo aparelho devido ao seu comprimento de onda emitido. O plasma foi diluído na proporção de 1:100 quando necessário.

4.7. Experimento V: Efeito da administração de angiotensina II e losartana intracerebroventricular em condições basais e após privação alimentar

4.7.1. Cirurgia estereotáxica para implante de cânula-guia no ventrículo lateral

Ratos Wistar machos ($319,5 \pm 4,88$ g; $n=37$) foram anestesiados com cetamina e xilazina (75 e 25 mg/kg, respectivamente, por via intraperitoneal) e afixados a um aparelho estereotáxico (ASI Instruments, Warren, MI, EUA) por meio de duas barras auriculares. Para assepsia, era feito tricotomia do topo da cabeça e limpeza do local com algodão hidrófilo embebido com tintura de iodo e, posteriormente, álcool etílico 70%. Foi realizada uma injeção subcutânea de 0,1 mL de lidocaína 1% para anestesia local na área da incisão. Era feita então uma incisão longitudinal abrangendo-se a pele e tecido celular subcutâneo, expondo a região superior do crânio exatamente subjacente à incisão, a qual foi tratada com solução fisiológica e água oxigenada 10%, a fim de realizar completa limpeza da área para visualização clara das suturas que formam os pontos de referência bregma e lambda. A torre do estereotáxico com a cânula-guia, confeccionada a partir de agulhas hipodérmicas (aço inoxidável, 25 x 0,7 mm) com 12 mm de comprimento, era então posicionada em angulação zero e a cabeça do animal ajustada até que os pontos bregma e lambda estivessem localizados no mesmo plano horizontal. Em seguida, foram realizadas as leituras dos parâmetros ântero-posterior, látero-lateral e dorso-ventral, tomando-se como referência o bregma. Com auxílio das informações de um atlas estereotáxico (PAXINOS; WATSON, 2006) e estudos anteriores realizados por nosso grupo (DOS-SANTOS *et al.*, 2017), foi determinado o ponto de introdução da cânula-guia (0,5 mm posterior ao Bregma, 1,4 mm a partir da linha média longitudinal). Foi então realizada a trepanação na calota craniana utilizando-se de broca odontológica esférica acoplada a um motor de baixa rotação. Através do orifício produzido pela trepanação, a cânula-guia era introduzida até 3,6 mm abaixo da superfície óssea, de modo que a extremidade inferior da cânula fosse implantada 1 mm acima do limite dorsal do ventrículo cerebral lateral direito. Na sequência, a cânula era fixada utilizando-se de resina acrílica (metacrilato) que, por sua vez, foi fixada no crânio por dois diminutos parafusos de aço inoxidável. Em seguida à completa

fixação das cânulas-guia, a torre do estereotáxico era suspensa. A fim de evitar a obstrução das cânulas-guia ou contaminação encefálica por agentes externos, foi introduzido um mandril (de mesmo comprimento da cânula-guia e confeccionado com fio de aço inoxidável) no interior de cada cânula. Como medida profilática, os animais receberam Pentabiótico veterinário IM [160.000 U.I./rato, via IM, (Fort-Dodge, Campinas, SP, Brasil)] e Cetoprofeno SC [3mg/kg, SC, (Vencofarma, Londrina, PR, Brasil)] em seguida ao procedimento cirúrgico. O sucesso na cirurgia era verificado após a eutanásia no final do estudo pela administração de 2 µL azul de Evans 2% pela cânula-guia observação a fresco por meio de corte coronal do encéfalo coletado. Com efeito, apenas os animais que apresentam marcação na cor azul nos ventrículos cerebrais e em áreas por ele atingidas foram considerados na análise de resultados. A proporção de animais com as cânulas corretamente posicionadas ao final do experimento foi de 91,9% (34/37) sendo 5,4% (2/37) animais que perderam o capacete e a cânula-guia, e um (2,7%) que adoeceu e não foi usado para análise. Ao final, entre os animais viáveis (descontando os que perderam o capacete ou adoeceram), a proporção de acerto foi de 85,3%.

4.7.2. *Gaiola metabólica e microinjeção i.c.v.*

Após 6-7 dias recuperação da cirurgia e 3-4 dias de adaptação as gaiolas metabólicas, os animais eram manipulados para a retirada do mandril e devolvidos as gaiolas. Pouco antes do início do período escuro (que se iniciava às 18:00, período de maior atividade locomotora e de alimentação espontânea dos animais) os animais alimentados eram pesados e era feita a microinjeção lenta (por 1 minuto) de 2 µL de veículo (NaCl 0,9%), angiotensina II (12,5 nM) ou losartana potássica (50nM). A microinjeção era feita utilizando-se de uma seringa de precisão Hamilton de 10 µL conectada a uma agulha gengival 1,0 a 1,5 mm mais longo que a cânula-guia por meio de um tubo de polietileno PE10. Após a microinjeção, a cânula-guia era ocluída novamente com o mandril e os animais eram devolvidos às suas respectivas gaiolas metabólicas sem bebedouros ou ração e, após 15 minutos, eram reapresentados a água e a comida. A partir deste tempo, eram avaliados os consumos cumulativos de líquidos e ração nos tempos 30, 60, 120, 180 e 240 minutos e 12 horas pós a reapresentação sob efeito da microinjeção aguda. Os animais voltariam a ser pesados 4 e 12 horas após a reapresentação. Os valores de ingestão e excreção urinária foram padronizados por 100g de peso corporal.

Depois deste primeiro teste os animais eram deixados para se recuperar por 2 dias e então tiveram a ração retirada para iniciar o período de privação alimentar de 48 horas, no qual permaneceram com livre acesso à água filtrada. Ao se completarem 48h de privação alimentar, os animais foram aleatoriamente divididos em 3 grupos que receberam veículo, ANG II e losartana, nas mesmas doses do experimento anterior, também no período noturno. 15 minutos após, água e ração foram reapresentadas, e a ingestão cumulativa de ambos foi avaliada após 30, 60, 120, 180 e 240 minutos e finalmente 12h. Os animais também foram pesados nos tempos 0, 4 e 12 horas.

4.8. *Análise Estatística*

Em todos os dados foi aplicado teste de normalidade Shapiro-Wilk foi aplicado para avaliar a distribuição dos dados e teste ROUT (Q=10%) foi usado para exclusão de resultados aberrantes (*outliers*). Análise de variância de uma via (One-way ANOVA) com pós-teste de Tukey para múltiplas comparações foi usado para a maior parte das comparações, com

exceção dos experimentos de cultura celular para análise da expressão gênica e ingestão de água e comida ou volume urinário em diferentes períodos temporais, nos quais foi aplicado a análise de variância de duas vias (Two-way ANOVA), novamente com pós-teste de Tukey. Teste *t* de Student foi usado para comparação do potencial de membrana entre os neurônios que despolarizavam e que não respondiam a ANG II nos experimentos de eletrofisiologia (protocolo II). Para as análises e construção dos gráficos, foi usado o programa Prism 6 (GraphPad Software, versão 6.01) e todos resultados estão representados como média \pm erro padrão da média. O intervalo de contingência foi 95% ($P < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Experimento I: Efeito da concentração de glicose sobre a expressão dos receptores AT_{1a} em cultura de células dissociadas do SFO

Células dissociadas do SFO e incubadas em diferentes concentrações de glicose não demonstraram diferenças significativas na expressão de AT_{1a} ($F_{(2, 33)}=1,52$, $P=0,23$). Entretanto, em todas as concentrações de glicose houve diferença significativa no fator tempo ($F_{(2, 33)}=23,39$, $P<0,0001$). Há diferença na expressão de AT_{1a} entre uma e 24 horas entre as três concentrações de glicose (1mM: $1,533\pm 0,186$ vs $0,451\pm 0,098$ a.u., $n=5$, $P=0,0002$; 5mM: $1,088\pm 0,208$ vs $0,236\pm 0,84$ a.u., $n=5$ e 4 respectivamente, $P=0,0057$; 10mM: $1,448\pm 0,358$ vs $0,634\pm 0,175$ a.u., $n=5$ e 4 respectivamente, $P=0,0084$) (Figura 3). Entre os grupos incubados com glicose a 1mM e 10mM, houve diferença significativa entre uma e seis horas (1mM: $1,523\pm 0,186$ vs $0,501\pm 0,131$ a.u., $n=5$, $P=0,0002$; 10mM: $1,448\pm 0,358$ vs $0,634\pm 0,175$ a.u., $n=5$ e 4 respectivamente, $P=0,0084$).

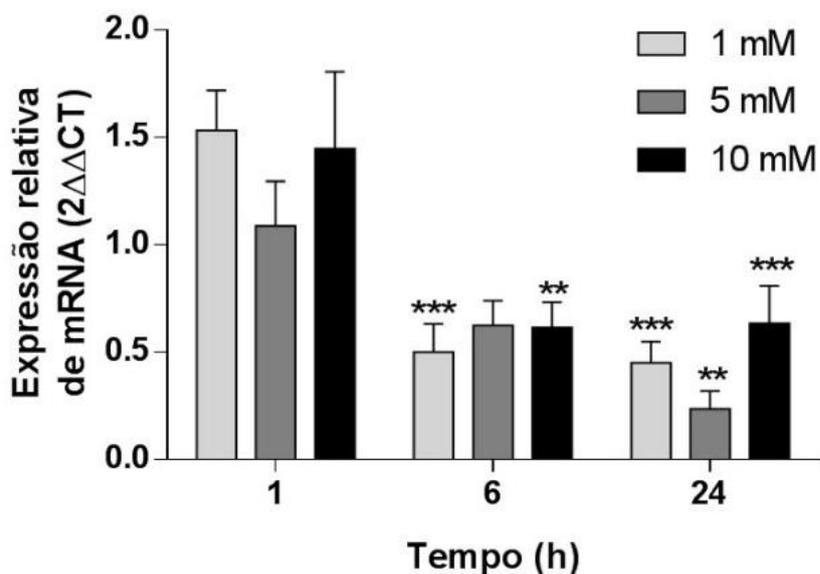


Figura 3. Expressão de mRNA para AT_1 em cultura celular do SFO em diferentes concentrações de glicose. Gráficos mostram os resultados para RT-qPCR de células do SFO cultivadas em três diferentes concentrações de glicose (1mM, 5mM e 10mM) em três tempos diferentes (1h, 6h e 24h). ** $P<0,01$; *** $P<0,0001$ comparado com o mesmo grupo à 1h.

5.2. Experimento II: Caracterização eletrofisiológica de neurônios isolados do SFO responsivos a ANG II quanto a sensibilidade a glicose

5.2.1. Perfil de glicossensibilidade de neurônios responsivos a ANG II

O experimento eletrofisiológico usou a técnica de *patch-clamp* perfurado para determinar primeiro a responsividade dos neurônios do SFO à glicose, para depois determinar o efeito da ANG II nestes mesmos neurônios. Para avaliação da glicossensibilidade, usou-se tanto diminuição (10mM para 5mM, n=68) como aumento (5mM para 10mM, n=22) de glicose na solução de aCSF usada no banho. Neurônios do SFO responsivos à glicose foram classificados como mostrado nas figuras 4 e 5. É importante salientar que algumas respostas eletrofisiológicas a alteração de glicose no meio foram um tanto longas como mostrado na figura 4D. Aproximadamente metade dos neurônios que respondem com alteração da voltagem da membrana as mudanças da glicose no meio mostraram resposta mais longas do que 1000 segundos (49,8%; n=21/43; $2130 \pm 275,6$ s, Fig.4D) e a outra metade uma resposta inferior a este tempo (51,2%; n=22/43; $624,5 \pm 58,39$ s). Um total de 26,7% das células testadas foram classificadas como GI [n=24/90, onde 19 despolarizavam quando a concentração de glicose era abaixada de 10mM para 5mM ($5,732 \pm 0,8334$ mV) e 5 hiperpolarizavam quando a concentração de glicose aumentava ($-4,5 \pm 0,8334$ mV)], 21,1% como GE [n=19/90, onde 10 hiperpolarizavam quando a concentração de glicose era diminuída ($-3,9 \pm 0,5022$ mV) e 9 despolarizavam quando a concentração de glicose da solução de registro era aumentada de 5mM para 10mM ($5,011 \pm 1,02$ mV)] e 52,2% foram classificadas como nGS (n=47/90, e o potencial de membrana foi de $0,6957 \pm 0,2989$ mV). Ainda, 52,2% das células testadas respondem a ANG II com despolarização (n=47/90, com aumento médio de $5,6 \pm 0,5$ mV no potencial de membrana), enquanto demais células não foram afetadas (n=43/90, com potencial médio de membrana de $0,5 \pm 0,2$ mV, $P < 0,0001$). Alguma fração de neurônios responsivos a ANG II foi encontrada em cada um dos três fenótipos de glicossensibilidade, sendo 52% nos neurônios GE (n=10/19), 71% nos neurônios GI (n=17/24) e 43% dos nGS (n=20/47), como mostrado nas figuras 6 e 7.

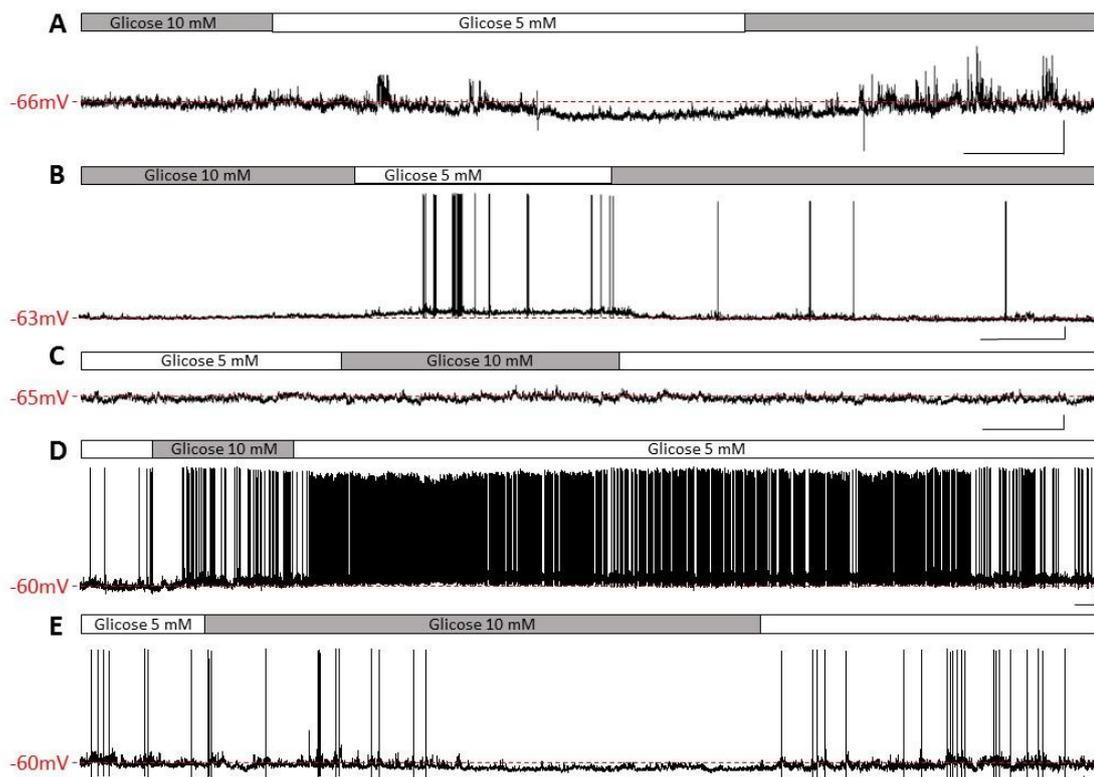


Figura 4. Classificação de neurônios do SFO de acordo com as alterações de concentração de glicose. Segmentos representativos de registros *current-clamp* de diferentes respostas a alteração de glicose. A, B e C são neurônios incubados e inicialmente registrados a glicose a 10mM (cinza) e resposta à glicose foi evocada pela diminuição da concentração de glicose a 5mM (branco). Neurônios que hiperpolarizam quando a concentração de glicose diminui foram classificados como glicoinibidos (GI, B), e neurônios que não alteram seu potencial de membrana foram considerados como não-glicossensíveis (nGS, C). D e E mostram registros representativos de neurônios incubados e inicialmente registrados a 5mM de glicose e depois alterado a 10mM. Neste protocolo, neurônios que despolarizam em resposta ao aumento na concentração de glicose foram classificados como GE (D), enquanto neurônios que hiperpolarizam foram considerados como GI (E). Linha pontilhada representa o potencial de membrana basal. Barra de escala: 10mV x 100s.

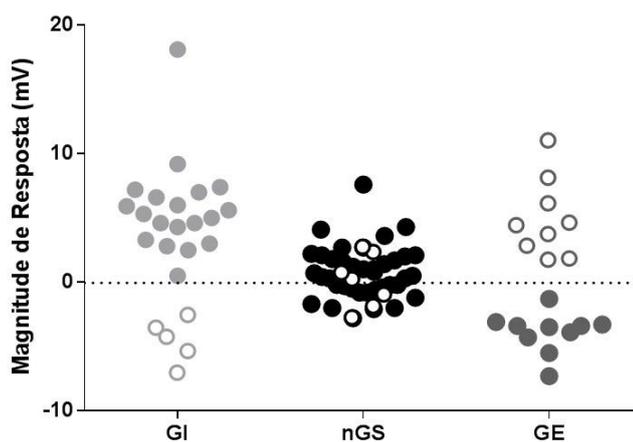


Figura 5. Magnitude de resposta de cada neurônio do SFO as alterações de glicose no meio de registro. Distribuição da magnitude de resposta à glicose nos neurônios do SFO testados (n=90). Preto corresponde aos neurônios não-glicossensíveis (nGS), cinza claro aos glicoinibidos (GI) e cinza escuro aos glicoexcitáveis (GE). Círculos abertos correspondem às células inicialmente registradas a 5mM e a resposta a glicose era testada aumentando para 10mM; Neste caso, neurônios GI eram identificados por hiperpolarização e GE por despolarização. Círculos fechados são células que eram inicialmente registradas a 10mM de glicose e eram alteradas para 5mM para testar a responsividade a glicose. Células que despolarizavam eram classificadas como GI e as que respondiam com hiperpolarização eram classificadas como GE.

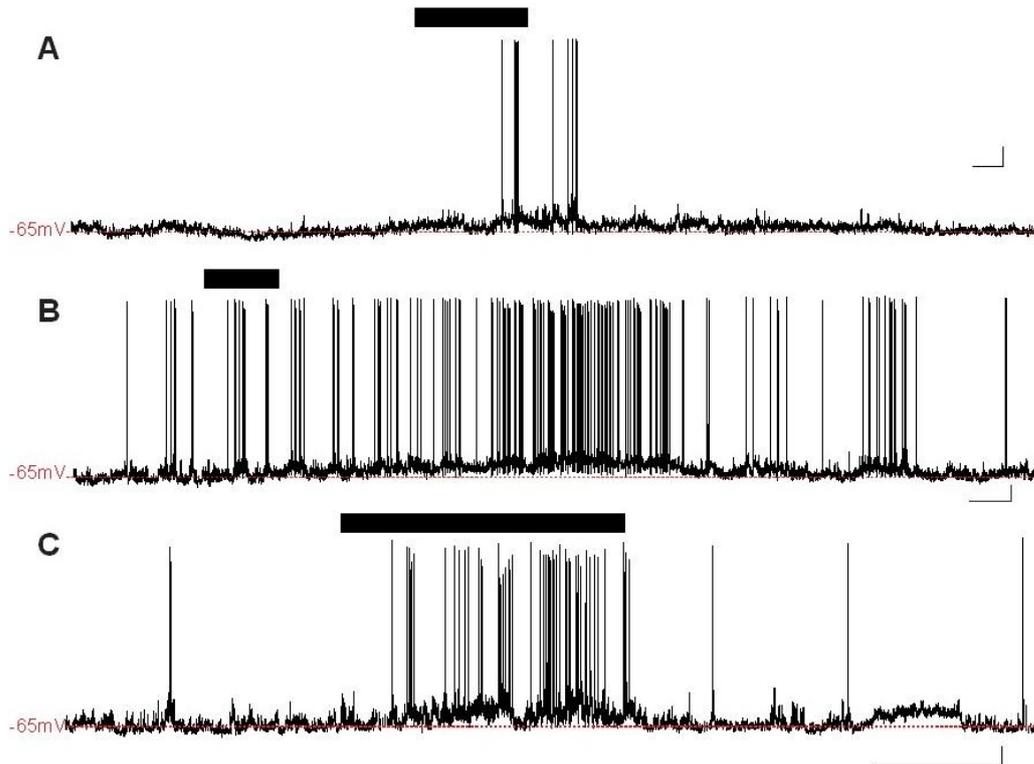


Figura 6. Resposta a angiotensina II em neurônios do SFO com diferentes perfis de glicosensibilidade. Segmentos representativos de registros *current-clamp* de resposta a angiotensina II de neurônios glicoinibidos (A), não-glicossensíveis (B) e glicoe excitáveis (C). Barras pretas correspondem ao momento onde a angiotensina II era perfundida no banho. Linhas pontilhadas representam o potencial de membrana basal. Barra de escala: 10mV x 50s.

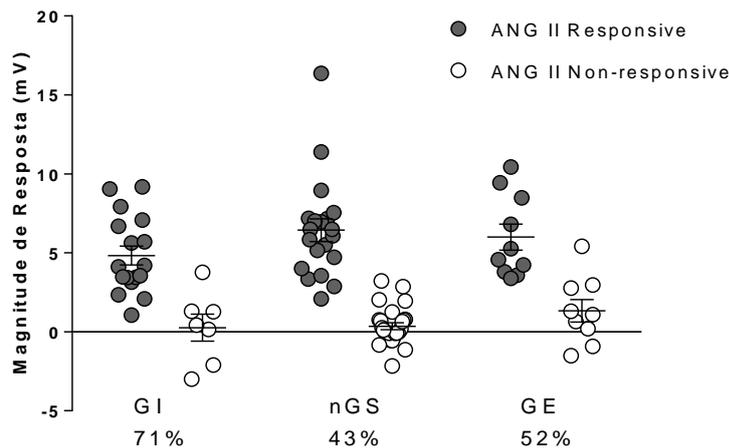


Figura 7. Distribuição da magnitude de resposta a angiotensina II de acordo com o perfil de glicosensibilidade em neurônios do SFO. Neurônios que despolarizam (cinza) ou não respondiam (branco) à aplicação de angiotensina II divididos por sua resposta a glicose, tanto como glicoinibidos (GI), glicoe excitáveis (GE) ou não-glicossensíveis (nGS). A proporção das respostas à angiotensina II está demonstrada em valores numéricos e mostram que a proporção de neurônios GI são os que tem mas maiores respostas a ANG II.

5.2.2. Resposta a ANG II em diferentes concentrações de glicose

O segundo passo dos estudos eletrofisiológicos foi determinar se alterações agudas na concentração de glicose poderiam modular a responsividade de um mesmo neurônio à ANG II. Para avaliar esta possibilidade, as células eram incubadas e registradas inicialmente a 5mM de glicose e testadas para ANG II. A concentração de glicose era então alterada para 10mM e o mesmo neurônio testado novamente para ANG II, como mostrado na figura 8. A 5mM de glicose, 42% dos neurônios despolarizavam em resposta à ANG II ($6,2\pm 1,0\text{mV}$, $n=12/29$) e quando a concentração de glicose era aumentada para 10mM, a proporção de resposta passou a ser de 55% ($8,3\pm 2,0\text{mV}$, $n=16/29$). Ou seja, todos os neurônios que responderam a ANG II a 5mM continuavam a responder a 10mM e um total de quatro neurônios (23,5%, $n=4/17$) não respondiam a ANG II a concentração de glicose de 5mM e passaram a responder a 10mM. Estes quatro neurônios eram de diferentes fenótipos de glicosensibilidade (um GI, um GE e dois nGS), como pode ser observado na figura 8. A proporção de neurônios identificados nesta série de experimentos foi 27,5% de GE ($2,7\pm 1,1\text{mV}$, $n=8/29$), 34,5% de GI ($-4,89\pm 1,05\text{mV}$, $n=10/29$) e 37,9% nGS ($0,864\pm 0,57\text{mV}$, $n=11/29$). Apesar de termos observado um aumento no número de neurônios responsivos a ANG II em 10mM de glicose, isso não se refletiu na magnitude da resposta em relação a quando os neurônios eram registrados a 5mM ou 10mM de glicose (Fig.8D).

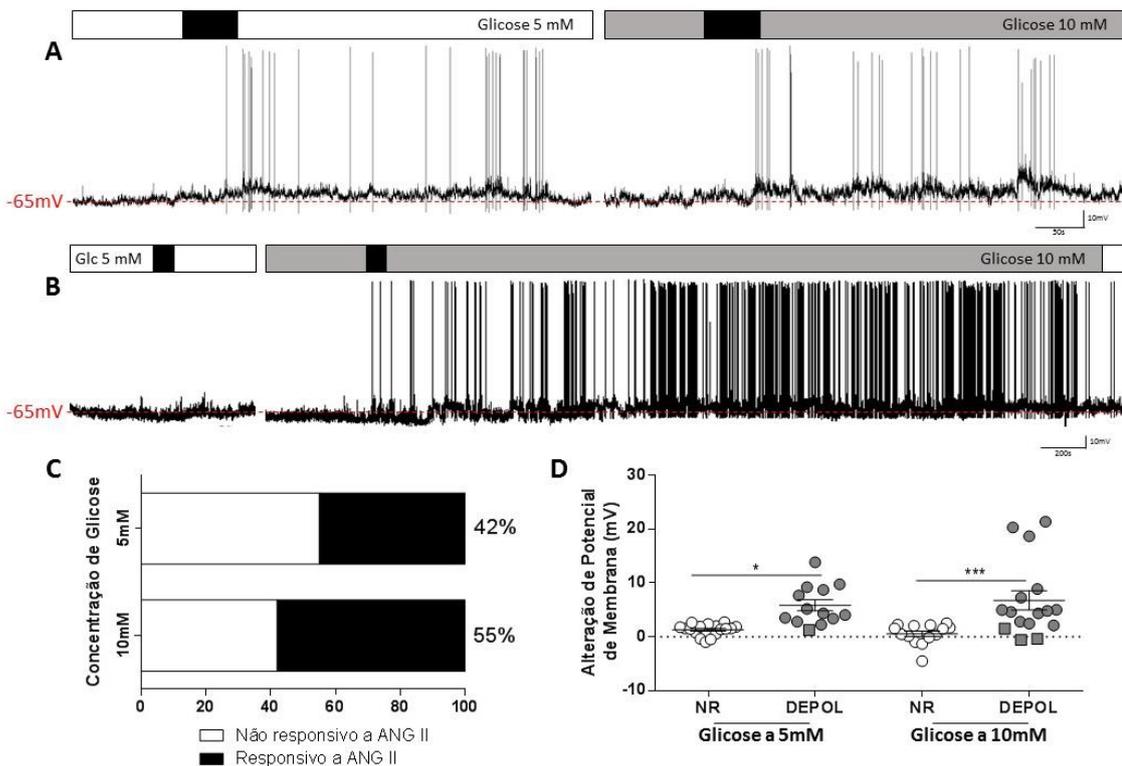


Figura 8. Resposta à angiotensina II em duas diferentes concentrações de glicose em neurônios do SFO. Traçados representativos de registros de *current-clamp* de A) um neurônio que responde a angiotensina II (ANG II, barras pretas) tanto a 5mM de glicose (barras brancas) como a 10mM (barras cinzas); e B) um neurônio que não respondia a 5mM mas respondeu a 10mM de glicose. Linhas tracejadas representam o potencial de membrana basal. A proporção e a magnitude de resposta a ANG II tanto em 5mM como em 10mM de glicose são mostrados em C e D respectivamente. Em D, quadrados representam neurônios cuja classificação da resposta foi dada pela alteração da frequência de disparos ao invés do potencial de membrana. * $p<0.05$; *** $p<0.001$

5.3. Experimento III: Efeito da privação alimentar no sistema renina-angiotensina periférico e expressão de receptores AT_{1a} no SFO

5.3.1. Variação de Peso Corporal

No primeiro set de experimentos *in vivo*, avaliamos os efeitos da privação alimentar em parâmetros relacionados ao balanço energético e cardiovascular. Como era esperado, houve diminuição no peso corporal dos animais evocado pelo jejum ($F_{(2, 21)}=84,48$; $P<0,0001$) e pelo tempo ($F_{(2, 42)}=124,1$; $P<0,0001$), com interação entre estes fatores ($F_{(2,42)}=30,99$; $P<0,0001$) (Fig.9A). No primeiro dia após o início do experimento, houve diminuição do peso corporal apenas do grupo 48h de jejum ($-25,63\pm 4,26g$ vs $9,625\pm 1,34g$ comparado ao controle, $n=8$, $P<0,0001$). No último dia, é possível observar diferença não só do grupo 48h em comparação ao controle ($-39,25\pm 4,07g$ vs $6,75\pm 1,13g$, $n=8$, $P<0,0001$), como também quando comparado ao grupo 24h ($-39,25\pm 4,07g$ vs $-22,75\pm 1,61g$, $n=8$, $P<0,0001$), assim como também há diminuição do peso corporal do grupo com 24h de jejum comparado ao controle ($-22,75\pm 1,61g$ vs $6,75\pm 1,3g$, $n=8$, $P<0,0001$). Quando observada a variação diária do peso corporal, no primeiro dia novamente temos diminuição do grupo 48h de jejum contra o grupo controle ($-25,63\pm 4,26g$ vs $9,625\pm 1,34g$) e, no último dia, diminuição do peso corporal entre o grupo 24h de jejum contra o controle ($-22,75\pm 1,61g$ vs $6,75\pm 1,13g$) e entre o grupo 48h de jejum contra o controle ($-13,63\pm 0,653g$ vs $6,75\pm 1,13g$) e contra o grupo 24h de jejum ($-13,63\pm 0,653g$ vs $-22,75\pm 1,61g$, $n=8$, $P=0,0152$) (Fig.9B).

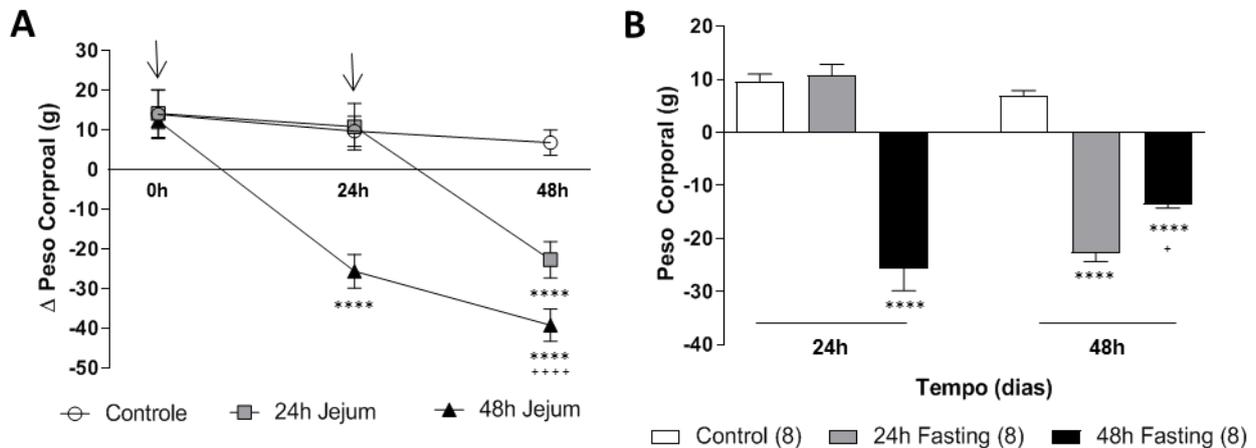


Figura 9. Variação de peso corporal durante privação alimentar. A) Variação cumulativa de peso corporal por dia após 24h (quadrado cinza) e 48h de jejum (triângulo preto), comparado aos animais com livre acesso a ração (controle, círculo branco). Seta a esquerda mostra momento em que houve a retirada da ração do grupo 48h Jejum, e seta a direita mostra o momento da retirada da ração do grupo 24h Jejum. B) Variação diária do peso corporal após 24h e 48h do início do experimento. ANOVA de uma via; **** $P<0,0001$ comparado ao controle; + $P<0,05$ e **** $P<0,0001$ comparado ao grupo jejum de 24h.

5.3.2. Glicemia e níveis plasmáticos de corticosterona e AVP

Quanto à glicemia, o jejum de um ou dois dias levou a diminuição da concentração de glicose circulante ($F_{(2, 15)}=8,526$; $P=0,0034$), tendo efeito significativo tanto nas primeiras 24h ($72,5\pm 12,41\text{mg/dL}$ vs $110,8\pm 3,321\text{mg/dL}$, $P=0,0383$) como às 48h de jejum ($51,33\pm 12,45\text{mg/dL}$ vs $110,8\pm 3,321\text{mg/dL}$, $P=0,002$) (Fig.10A). Houve um aumento significativo na corticosterona após 24h ($11,45\pm 1,49\mu\text{g/dL}$ vs $7,285\pm 0,656\mu\text{g/dL}$, $n=8$, $P=0,0297$) e tendência de aumento em 48h ($10,86\pm 1,02\mu\text{g/dL}$ vs $7,285\pm 0,656\mu\text{g/dL}$, $n=8$, $P=0,0654$) de jejum quando comparada ao controle [$F_{(2, 21)}=4,12$; $P=0,031$ (Fig.10B)]. A concentração de AVP plasmática não apresentou diferenças significativas nem em 24h ($0,7035\pm 0,0624\text{pg/mL}$ vs $0,7451\pm 0,1713\text{pg/mL}$, $P>0,9999$) nem em 48h ($0,5161\pm 0,0664\text{pg/mL}$ vs $0,7451\pm 0,1713\text{pg/mL}$, $P=0,32661$) comparada ao controle [$F_{(2, 21)}=1,186$; $P=0,325$ (Fig.10C)].

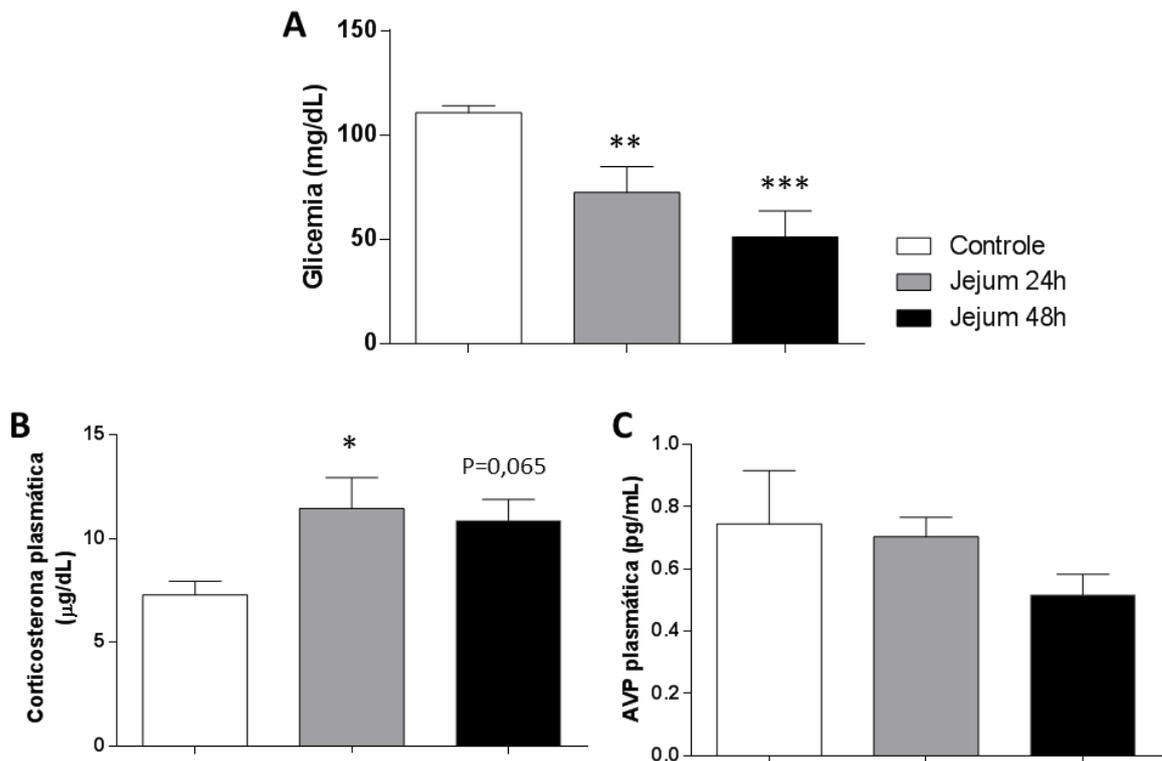


Figura 10. Glicemia e níveis plasmáticos de corticosterona e AVP de animais mantidos em privação alimentar de 24h e 48h. Glicemia (A) e níveis plasmáticos de corticosterona (B) e vasopressina [AVP (C)] após 24h (cinza) e 48h (preto) de jejum comparados a seu controle (branco). ANOVA de uma via; * $P\leq 0,05$; ** $P<0,01$ *** $P<0,001$

5.3.3. Concentração plasmática de ANG I e II e expressão de mRNA para AT_{1a} no SFO

ANG I plasmática encontra-se aumentada após 24h ($191,5 \pm 33,16 \text{ pg/mL}$ vs $50,27 \pm 7,173 \text{ pg/mL}$, $P=0,001$) e 48h ($180,8 \pm 24,88 \text{ pg/mL}$ vs $50,27 \pm 7,173 \text{ pg/mL}$, $P=0,0021$) de privação alimentar [$F_{(2, 21)}=10,49$; $P=0,0007$ (Fig.11A)]. Também a ANG II plasmática estava elevada depois de 24h ($152,9 \pm 19,28 \text{ pg/mL}$ vs $58,14 \pm 8,13 \text{ pg/mL}$, $P=0,001$) e 48h ($114,7 \pm 18,85 \text{ pg/mL}$ vs $58,14 \pm 8,13 \text{ pg/mL}$, $P=0,045$) de jejum [$F_{(2, 21)}=8,6$; $P=0,019$ (Fig.11B)]. A expressão de mRNA para o receptor AT_{1a} (mais importante subtipo de AT₁ nos ratos) mostrou participação no fator tratamento ($F_{(2, 21)}=18,77$; $P<0,0001$), sem alteração significativa após 24h de jejum ($1,79 \pm 0,33 \text{ a.u.}$ vs $1,24 \pm 0,29 \text{ a.u.}$, $n=8$, $P=0,24$), mas com aumento de quase de cinco vezes na expressão de AT_{1a} depois de 48 horas de privação alimentar ($5,22 \pm 0,76 \text{ a.u.}$ vs $1,24 \pm 0,29 \text{ a.u.}$, $n=8$, $P<0,0001$) (Fig.11C).

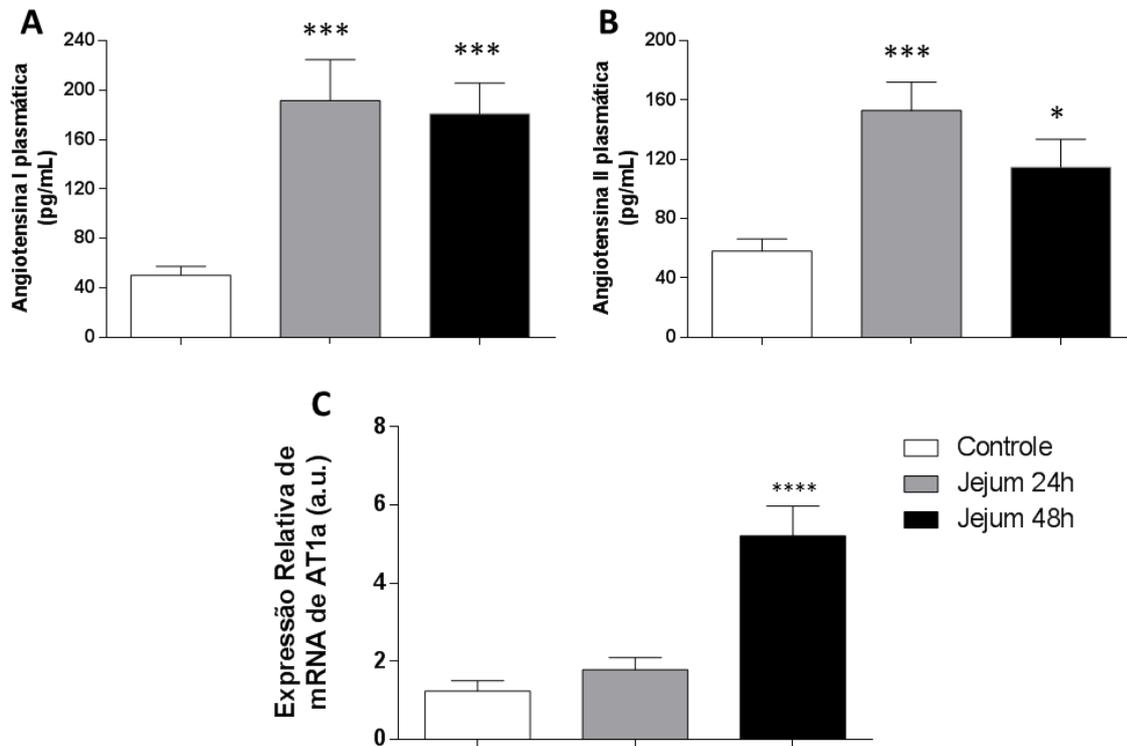


Figura 11. Níveis plasmáticos de angiotensinas e expressão de AT_{1a} no SFO de animais mantidos em privação alimentar de 24h e 48h. Níveis plasmáticos de angiotensina II (A) e angiotensina I (B) e expressão relativa de mRNA para AT_{1a} no SFO (C) de animais mantidos em jejum por 24h (cinza) e 48h (preto) comparados a seu controle (branco). ANOVA de uma via; * $P \leq 0,05$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$

5.4. Experimento IV: Efeito do bloqueio periférico de receptores AT₁ na ingestão alimentar e hídrica após privação alimentar

5.4.1. Ingestão de fluidos, dose da losartana, excreção urinária, hematócrito e sódio plasmático no jejum

Durante o jejum houve diminuição significativa na ingestão fluidos ($F_{(1, 20)}=253,5$; $P<0,0001$), sem efeito do tratamento com losartana ($F_{(1, 20)}=0,415$; $P=0,527$) ou interação entre os fatores ($F_{(1, 20)}=3,3$; $P=0,084$) nas primeiras 24h. Houve diminuição estatisticamente significativa entre os grupos jejum e seus respectivos controles [$4,072\pm 0,4963\text{mL}/100\text{g}$ vs $14,1\pm 0,5953\text{mL}/100\text{g}$ de ingestão de água filtrada ($P<0,0001$) e $3,238\pm 0,765\text{mL}/100\text{g}$ vs $15,85\pm 0,9138\text{mL}/100\text{g}$ de ingestão diária de solução com losartana ($P<0,0001$)]. Resultado similar foi encontrado com 48h de jejum, onde houve novamente efeito do jejum na diminuição da ingestão ($F_{(1, 20)}=40$; $P<0,0001$), mas não do tratamento com losartana ($F_{(1, 20)}=2,8$; $P=0,11$), ainda sem interação entre os fatores ($F_{(1, 20)}=0,0014$; $P=0,971$). Houve diferença entre jejum e seus controles [$2,143\pm 0,3057\text{mL}/100\text{g}$ vs $13,56\pm 0,5419\text{mL}/100\text{g}$ no grupo água ($P<0,0001$) e $5,212\pm 2,668\text{mL}/100\text{g}$ vs $16,49\pm 2,317\text{mL}/100\text{g}$ no grupo losartana ($P<0,0001$)] (Fig.12A). Sabendo que os animais em jejum bebem menos água, usamos uma concentração maior de losartana na água de beber a ser oferecido a este grupo durante a privação alimentar (70mg/L) em relação ao grupo controle (35mg/L). Mesmo assim, houve diminuição na dose de losartana causada pela privação alimentar ($F_{(1, 10)}=7,703$; $P=0,019$), mas não do tempo ($F_{(1, 10)}=0,489$; $P=0,5$) e sem interação entre os fatores ($F_{(1, 10)}=0,254$; $P=0,625$). Nas análises em múltiplas comparações, nas primeiras 24 horas há apenas uma tendência na diferença das doses de losartana entre controle e jejum ($5,547\pm 0,32\text{mg}/\text{kg}/\text{dia}$ vs $2,267\pm 0,536\text{mg}/\text{kg}/\text{dia}$, $P=0,083$), mas não mais no segundo dia ($5,77\pm 0,811\text{mg}/\text{kg}/\text{dia}$ vs $3,649\pm 1,868\text{mg}/\text{kg}/\text{dia}$, $P=0,348$).

Quanto a excreção urinária, nas primeiras 24h não houve diferenças no volume quanto ao tratamento com losartana ($F_{(1, 20)}=0,4146$; $P=0,527$), mas sim quanto ao desafio da privação alimentar ($F_{(1, 20)}=4,47$; $P=0,047$), sem interação entre os fatores ($F_{(1, 20)}=4,467$; $P=0,532$). Às 48 horas, mantém-se o padrão de efeito sobre o fator condição alimentar ($F_{(1, 20)}=33,94$; $P<0,0001$) e não do fator tratamento ($F_{(1, 20)}=1,624$; $P=0,217$), sem interação entre os fatores ($F_{(1, 20)}=0,149$; $P=0,704$) (Fig.12B), enquanto nas comparações múltiplas, há diminuição significativa entre animais em jejum dos grupos água e losartana comparados a seus controles que tiveram livre acesso a ração ($3,691\pm 0,45\text{mL}/100\text{g}$ vs $5,743\pm 0,339\text{mL}/100\text{g}$ no grupo água, $P=0,0006$, e $4,555\pm 0,8127\text{mL}/100\text{g}$ contra $6,604\pm 0,4553\text{mL}/100\text{g}$ no grupo losartana, $P=0,002$).

Após 48h de jejum, o hematócrito não teve diferença significativa quanto ao tratamento com losartana ($F_{(1, 19)}=1,45$; $P=0,2435$), mas mostrou diminuição provocada pela condição alimentar ($F_{(1, 19)}=7,465$; $P=0,0132$), sem interação entre os fatores ($F_{(1, 19)}=0,286$; $P=0,599$) (Fig.13A). Já na concentração plasmática de sódio, não houve diferença significativa nem quanto ao tratamento ($F_{(1, 20)}=4,1$; $P=0,057$) nem quanto a condição alimentar ($F_{(1, 20)}=0,22$; $P=0,65$), tampouco interação entre eles ($F_{(1, 20)}=1,753$; $P=0,201$) (Fig.13B).

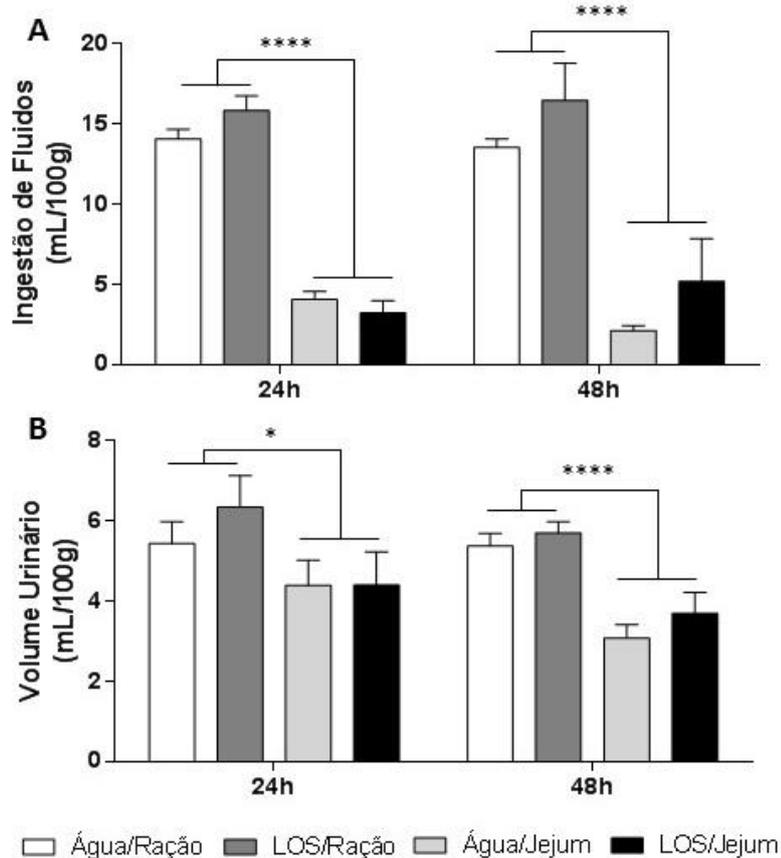


Figura 12. Ingestão de fluidos e volume urinário após 24h e 48h de jejum de animais com acesso exclusivo a água ou a losartana na água de beber. Valores padronizados pelo peso corporal de ingestão de fluidos (A) e volume urinário excretado (B) diários, ambas expressas em mL/100g após 24h e 48h dos grupos com acesso a água filtrada com e sem privação alimentar (respectivamente Água/Jejum e Água/Ração) e dos grupos com acesso exclusivo a solução de losartana como única fonte hídrica com e sem acesso a ração *ad libitum* (respectivamente LOS/Ração e LOS/Ração). ANOVA de duas vias, e significância demonstrada entre os desafios no mesmo tempo; * $P \leq 0,05$; **** $P < 0,0001$.

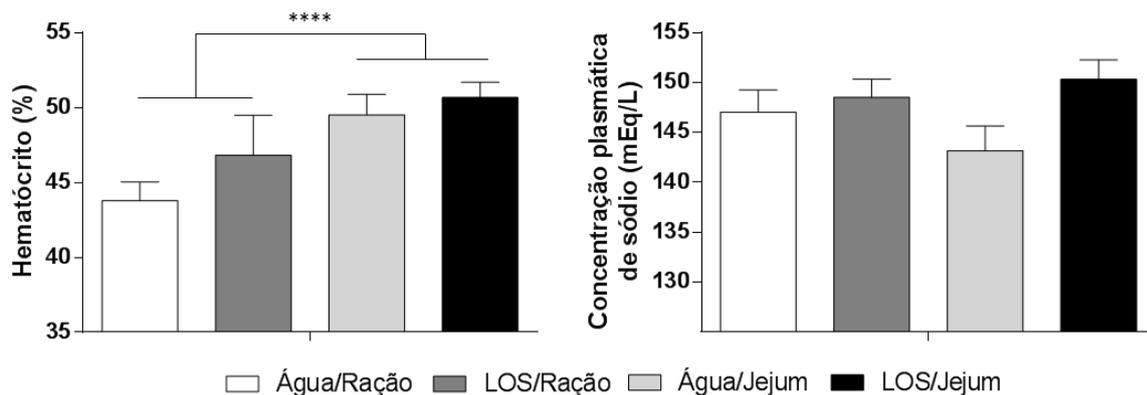


Figura 13. Hematócrito e sódio plasmático após 48h de privação alimentar. Gráficos resumem os dados de volume globular [hematócrito, expresso em % (A)] e sódio plasmático [mEq/L (B)] em condições de jejum e controle com ração *ad libitum* de animais bebendo água filtrada ou solução de losartana como única fonte de fluidos. * $P < 0,05$.

5.4.2. *Peso corporal, ingestão de ração e glicemia durante jejum e tratamento com losartana*

Na ingestão alimentar dos animais com livre acesso a ração, a ANOVA de duas vias mostrou que não houve variação provocada nem pela losartana ($F_{(1, 10)}=0,011$; $P=0,919$) nem pelo tempo de tratamento ($F_{(1, 10)}=0,0007$; $P=0,979$), e também não houve interação entre os fatores ($F_{(1, 10)}=0,71$; $P=0,42$) (Fig.14B).

Quanto à variação de peso corporal, nas primeiras 24h de jejum houve diminuição causada pela condição alimentar ($F_{(1, 20)}=219,3$; $P<0,0001$), mas não pelo tratamento com losartana ($F_{(1, 20)}=0,3625$; $P=0,554$), sem interação entre estes fatores ($F_{(1, 20)}=0,004$; $P=0,953$). 48h após o início da privação alimentar a fonte de variação foi novamente no desafio fisiológico ($F_{(1, 20)}=160,3$; $P<0,0001$) e não no tratamento ($F_{(1, 20)}=0,31$; $P=0,585$), sem interação entre os fatores ($F_{(1, 20)}=0,125$; $P=0,728$). Estas alterações indicam que o tratamento com losartana na água de beber não foi o suficiente para evitar alteração na perda de peso em após 24h e 48h de jejum, embora a privação alimentar tenha sido o suficiente para causar diminuição significativa entre os grupos jejum comparado a seus controle recebendo ração *ad libitum*, tanto no primeiro [-39,5±4,581g vs 1,333±1,453g no grupo recebendo água ($P<0,0001$) e -38±2,556g vs 3,167±1,014g no grupo com acesso exclusivo a losartana na água de beber ($P<0,0001$)] como no segundo dia [-18,83±0,833g vs 2,667±2,044 no grupo água ($P<0,0001$) e -17,33±1,145g vs 3±2,176g no grupo losartana ($P<0,0001$)] (Fig.14A).

Em relação à glicemia, em condições basais não houve diferença em nenhum dos grupos quanto ao tratamento ($F_{(1, 20)}=0,52$; $P=0,822$) ou desafio ($F_{(1, 20)}=0,468$; $P=0,502$) ou ainda integração entre os fatores ($F_{(1, 20)}=0,08$; $P=0,779$). Nas primeiras 24 horas de privação alimentar houve diminuição significativa da glicemia promovida pelo jejum ($F_{(1, 20)}=29,91$; $P<0,0001$), mas não pelo tratamento com losartana na água de beber ($F_{(1, 20)}=0,158$; $P=0,695$) sem interação entre estes fatores ($F_{(1, 20)}=1,53$; $P=0,231$). As diferenças mais marcadas foram a diminuição entre os grupos jejum frente suas contrapartes com acesso a comida [72,5±12,41mg/dL vs 125,8±44,094mg/dL do grupo água ($P=0,0007$) e 79,17±4,475mg/dL vs 112,8±7,884mg/dL do grupo losartana ($P=0,0334$)]. Após 48h de jejum, novamente há diminuição da glicemia evocada pelo jejum ($F_{(1, 20)}=37,87$; $P<0,0001$) e sem a influência do tratamento na variância ($F_{(1, 20)}=2,85$; $P=0,107$), mas há interação entre estes fatores ($F_{(1, 20)}=5,776$; $P=0,026$). Nas comparações múltiplas, além das já esperadas diferenças entre os animais em jejum contra seus controles [51,18±5,596mg/dL vs 122,8±4,277mg/dL do grupo água ($P<0,0001$) e 85,5±5,596mg/dL vs 116,8±8,643mg/dL do grupo losartana ($P=0,0119$)], foi observada uma diferença significativa entre os grupos em jejum: a glicemia do grupo tratado com losartana na água de beber foi significativamente maior que a dos animais com água (85,5±5,596mg/dL vs 51,18±5,596mg/dL, respectivamente; $P=0,0104$) (Fig.14C).

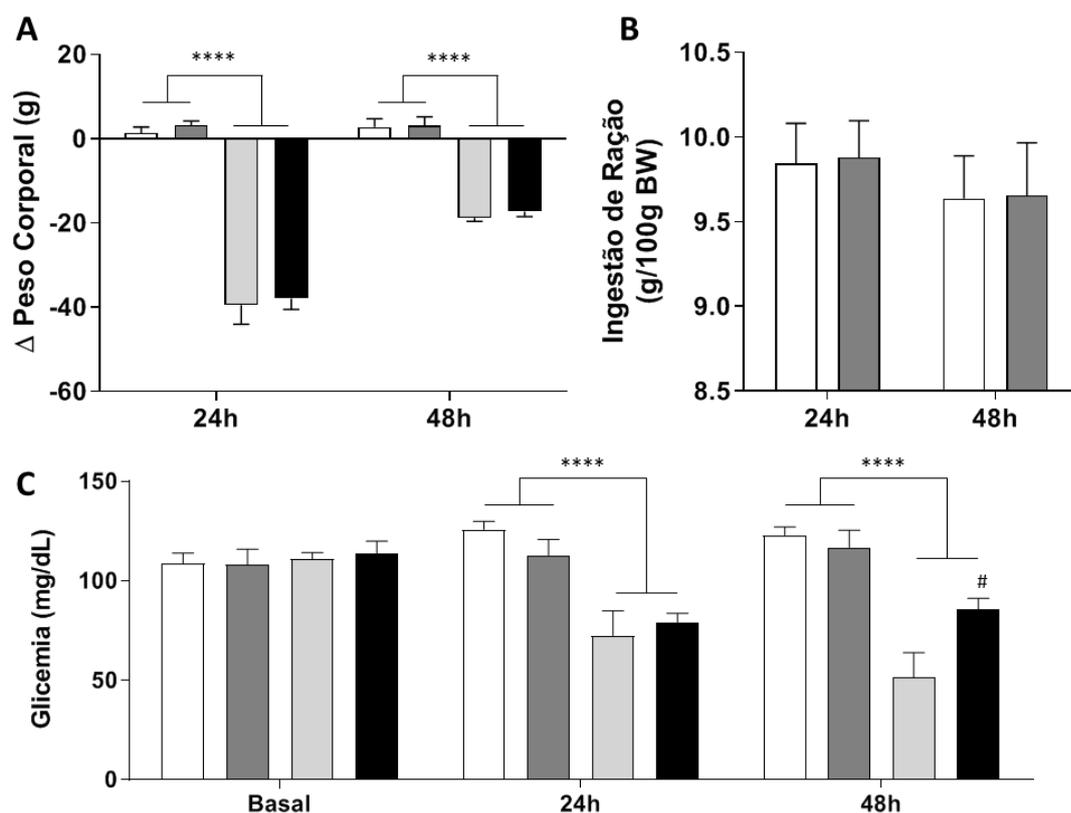


Figura 14. Variação de peso corporal, ingestão padronizada de ração e glicemia após 24h e 48h de jejum de animais com acesso exclusivo a água ou a losartana na água de beber. O gráfico A mostra a variação de peso corporal (g) comparado ao último peso registrado nos tempos de 24h e 48h de animais com acesso a água filtrada com e sem privação alimentar (grupos Água/Jejum e Água/Ração, respectivamente) e dos grupos com acesso exclusivo a solução de losartana como única fonte hídrica com e sem livre acesso a ração (grupos LOS/Ração e LOS/Jejum, respectivamente). O gráfico B mostra a ingestão de comida padronizada pelo peso corporal expressa em g/100g após 24h e 48h dos grupos Água/Ração e LOS/Ração. Em C tem-se a glicemia (mg/dL) dos grupos experimentais em condições basais e após jejum de 24h ou 48h dos mesmos grupos. ANOVA de duas vias, com demonstração da participação do fator tratamento; ** P<0,01; ***<0,001 **** P<0,0001. # P<0,05 quando comparado LOS/Jejum contra Água/Jejum no pós-teste de Tukey.

5.4.3. *Ingestão de ração e fluidos após reapresentação de alimentos*

Depois da privação alimentar, os animais foram reapresentados a ração, e a ingestão de comida foi acompanhada de trinta minutos até 12 horas e os dados encontram-se resumidos na tabela 1 e graficamente representados na figura 15A. O tratamento com losartana indica redução na ingestão de ração aos 30 minutos ($F_{(1, 20)}=5,299$; $P=0,032$), que não se reflete nas múltiplas comparações neste tempo entre os grupos água e losartana que estavam em jejum ($P=0,287$). Na primeira hora, além do efeito do jejum ($F_{(1, 20)}=24,75$; $P<0,0001$), há tendência de efeito do tratamento ($F_{(1, 20)}=3,38$; $P=0,081$), sem interação entre eles ($F_{(1, 20)}=1,101$; $P=0,307$), bem como há comparação entre os grupos controle e losartana dos grupos que estavam em jejum ($P=0,07$) (Fig.15B).

Quanto à ingestão de fluidos, os dados encontram-se resumidos na tabela 2 e plotados na figura 16A. Aos 60 minutos, é o único tempo onde, além do jejum ($F_{(1, 20)}=40,91$; $P<0,0001$), há participação do tratamento com losartana ($F_{(1, 20)}=9,59$; $P=0,006$), e há interação entre os fatores ($F_{(1, 20)}=6,28$; $P=0,021$) (Fig.16B). Isso se reflete nas múltiplas comparações entre os grupos controle e losartana reapresentados a ração após jejum, onde há diminuição significativa entre os grupos LOS/Jejum com o Água/Jejum ($P=0,0046$). A partir deste momento não há mais diferença entre os grupos quanto ao tratamento com losartana.

Tabela 1. Valores da ingestão cumulativa de ração padronizado pelo peso corporal após privação alimentar de 48h

Tempo	Ingestão de ração padronizada (g/100g)				Estatística		
	Controle		Jejum		Desafio	Tratamento	Interação
	Água	Losartana	Água	Losartana			
30'	0,55 ± 0,2809	0,2 ± 0,1271	1,407 ± 0,1813	0,7633 ± 0,2413	F(1, 20)=10,8; P=0,0037	F(1, 20)=5,299; P=0,032	F(1, 20)=0,462; P=0,504
60'	0,577 ± 0,2716	0,3633 ± 0,2688	2,203 ± 0,1932	1,423 ± 0,3292	F(1, 20)=24,7; P<0,0001	F(1, 20)=3,38; P= 0,081	F(1, 20)=1,1; P=0,3066
120'	0,7317 ± 0,249	0,94 ± 0,5062	2,518 ± 0,1566	2,943 ± 0,2568	F(1, 20)=35,1; P<0,0001	F(1, 20)=0,98; P=0,334	F(1, 20)=0,115; P=0,738
180'	1,045 ± 0,1176	0,8983 ± 0,515	3,327 ± 0,3949	3,2 ± 0,2426	F(1, 20)=42,3; P<0,0001	F(1, 20)=0,15; P=0,701	F(1, 20)=0,0008; P=0,98
240'	1,185 ± 0,0822	1,078 ± 0,4712	3,928 ± 0,3694	3,432 ± 0,3374	F(1, 20)=54,2; P<0,0001	F(1, 20)=0,76; P=0,394	F(1, 20)=0,317; P=0,579
720'	6,495 ± 0,4711	5,997 ± 0,7725	9,648 ± 0,5956	9,218 ± 0,6908	F(1, 20)=24,6; P<0,0001	F(1, 20)=0,52; P=0,478	F(1, 20)=0,003; P=0,958

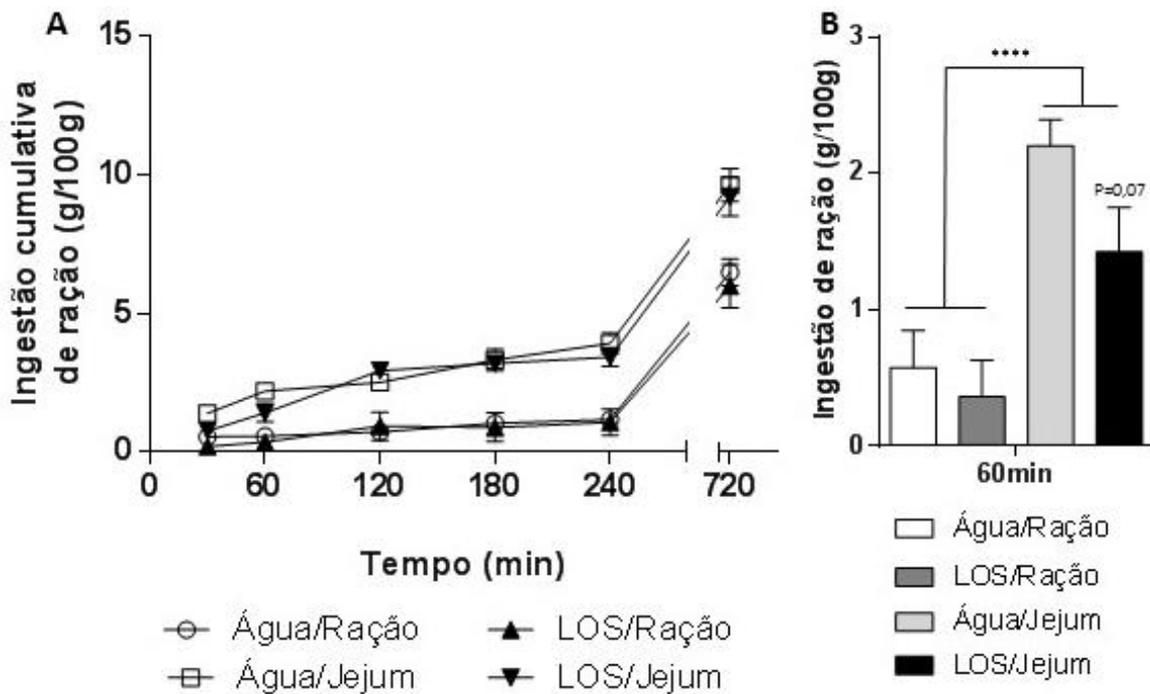


Figura 15. Ingestão cumulativa de comida na reapresentação de ração após 48h de privação alimentar em animais com acesso exclusivo a água ou a losartana na água de beber. A) Gráfico mostra ingestão cumulativa de ração nos tempos de 30, 60, 120, 180, 240 e 720 minutos após reapresentação de comida aos grupos que passaram por jejum de 48h recebendo água ou losartana como a única fonte hídrica (Água/Jejum e LOS/Jejum, respectivamente) e os que tiveram acesso a comida ad libitum e recebiam água ou jejum (Água/Ração e LOS/Ração, respectivamente). B) Ingestão de ração cumulativa no tempo de uma hora após a reapresentação de ração; asteriscos indicam significância da participação do desafio na ANOVA de duas vias. ****P<0,0001.

Tabela 2. Valores da ingestão cumulativa de fluidos (água filtrada ou solução de losartana) padronizado pelo peso corporal após privação alimentar de 48h

Tempo	Ingestão de fluidos padronizada (mL/100g)				Desafio	Estatística	
	Controle		Jejum			Tratamento	Interação
	Água	Losartana	Água	Losartana			
30'	0,6523 ± 0,237	0,2922 ± 0,1709	2,085 ± 1,005	0,7518 ± 0,3465	F(1, 20)=2,94; P=0,1	F(1, 20)=2,35; P=0,14	F(1, 20)=0,778; P=0,388
60'	0,804 ± 1,989	0,5383 ± 0,1953	4,808 ± 0,6805	2,288 ± 0,518	F(1, 20)=40,9; P<0,0001	F(1, 20)=9,59; P= 0,006	F(1, 20)=6,28; P=0,0209
120'	0,9295 ± 0,209	1,242 ± 0,3813	5,448 ± 0,6228	4,873 ± 0,4968	F(1, 20)=80,6; P<0,0001	F(1, 20)=0,08; P=0,776	F(1, 20)=0,9556; P=0,34
180'	1,026 ± 0,1826	1,292 ± 0,3991	7,054 ± 1,092	5,494 ± 0,3608	F(1, 20)=69,1; P<0,0001	F(1, 20)=1,1; P=0,306	F(1, 20)=2,199; P=0,154
240'	1,179 ± 0,2324	1,371 ± 0,4327	8,558 ± 1,075	6,691 ± 0,6327	F(1, 20)=89,7; P<0,0001	F(1, 20)=1,56; P=0,226	F(1, 20)=2,36; P=0,1403
720'	9,083 ± 0,773	9,190 ± 0,7595	19,35 ± 1,848	19,75 ± 1,503	F(1, 20)=63,3; P<0,0001	F(1, 20)=0,038; P=0,846	F(1, 20)=0,013; P=0,911

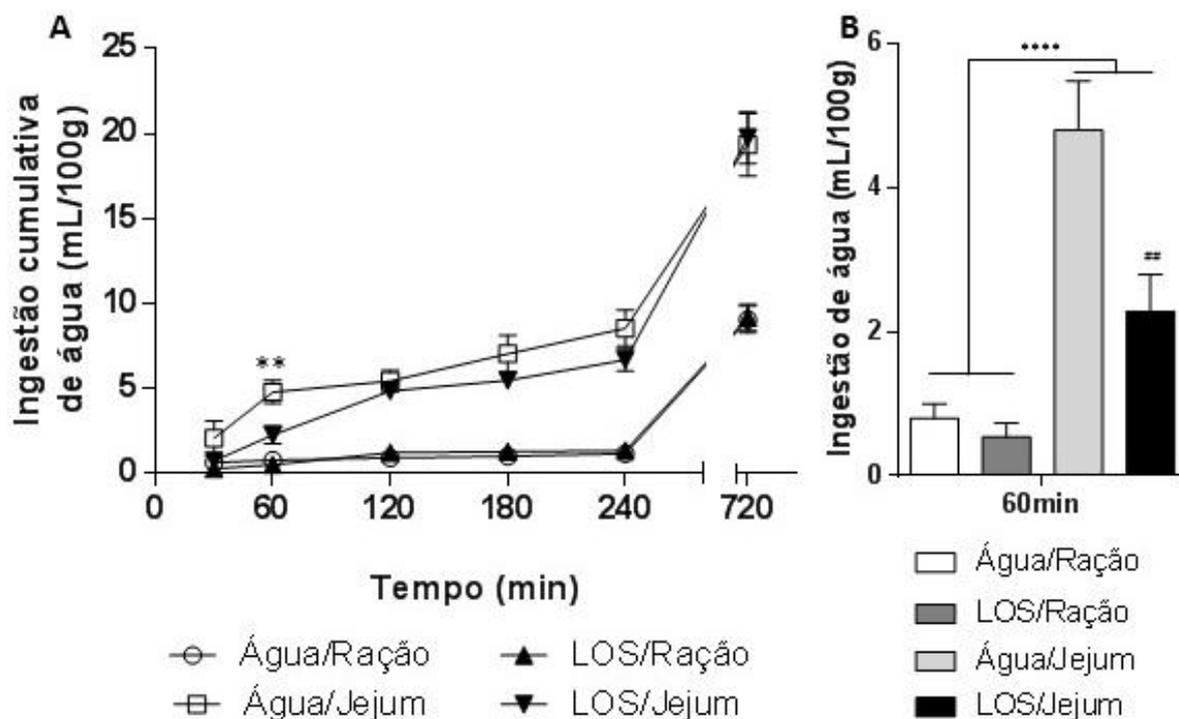


Figura 16. Ingestão cumulativa de água na reapresentação de ração após 48h de privação alimentar em animais com acesso exclusivo a água ou a losartana na água de beber. A) Gráfico mostra ingestão cumulativa de água nos tempos de 30, 60, 120, 180, 240 e 720 minutos após reapresentação de comida aos grupos que passaram por jejum de 48h recebendo água ou losartana como a única fonte líquida (Água/Jejum e LOS/Jejum, respectivamente) e os que tiveram acesso a comida *ad libitum* e recebiam água ou jejum (Água/Ração e LOS/Ração, respectivamente). Asteriscos indicam diferença nas múltiplas comparações entre os grupos Água/Jejum e LOS/Jejum. B) Ingestão de ração cumulativa no tempo de uma hora após a reapresentação de ração; asteriscos indicam significância da participação do desafio na ANOVA de duas vias; tralha indica diferença nas múltiplas comparações entre LOS/Jejum contra Água/Jejum. **P<0,001; ****P<0,0001; ## P<0,01.

5.4.4. *Peso corporal e volume urinário após reapresentação de alimentos*

Na variação do peso corporal quatro horas após a reapresentação de ração aos animais, há um esperado aumento de peso nos animais decido ao desafio do jejum ($F_{(1,20)}=91,72$; $P<0,0001$), mas não do tratamento com losartana ($F_{(1,20)}=0,966$; $P=0,3374$), e nem interação entre os fatores ($F_{(1,20)}=3,54$; $P=0,075$). Há aumento no peso corporal dos animais que foram mantidos em jejum por 48h em relação aos animais que tiveram acesso a comida por este tempo [$27,83\pm 4,785$ g contra seu controle $-6,167\pm 1,621$ g de ingestão de água filtrada ($P<0,0001$) e $19,33\pm 1,801$ g contra $-3,5\pm 1,621$ g de ingestão diária de solução com losartana ($P<0,0001$)]. Não houve, entretanto, diferença de peso corporal entre os animais recebendo água e losartana que foram mantidos em privação alimentar ($27,83\pm 4,785$ g vs $19,33\pm 1,801$ g, $P=0,113$). Depois de 12h, mantém-se a influência do desafio ($F_{(1,20)}=62,21$; $P<0,0001$) e não do tratamento ($F_{(1,20)}=0,015$; $P=0,904$), sem interação entre os fatores ($F_{(1,20)}=0,649$; $P=0,4298$) na variação do ganho de peso cumulativo. Foi observada diferença estatística significativa apenas entre os grupos previamente mantidos em jejum e seus controles [$34,33\pm 4,039$ g do Água/Jejum vs Água/Ração com $4,667\pm 3,051$ g ($P<0,0001$) e $31,17\pm 3,719$ g do LOS/Jejum vs $7\pm 2,671$ g do LOS/Ração ($P=0,0004$)] (Fig.17A).

Quanto ao volume de excreção urinária após a reapresentação, não houve diferença significativa no fator tratamento ($F_{(1,20)}=0,033$; $P=0,859$), apenas quanto ao desafio fisiológico ($F_{(1,20)}=6,28$; $P=0,021$) nas primeiras quatro horas, sem interação entre estes fatores ($F_{(1,20)}=1,346$; $P=0,2596$). Quando comparados os grupos água e losartana, não há diferenças entre água e jejum em condições basais ($0,9628\pm 0,1604$ mL/100g vs $0,7297\pm 0,0899$ mL/100g; $P=0,899$) nem após jejum ($1,283\pm 0,2138$ mL/100g vs $1,602\pm 0,834$ mL/100g; $P=0,7797$). Às 12 horas após a reapresentação, a mesma configuração se manteve, tanto nos fatores desafio ($F_{(1,19)}=5,47$; $P=0,0304$) e tratamento ($F_{(1,19)}=0,32$; $P=0,5783$) e interação ($F_{(1,19)}=1,869$; $P=0,1845$), mas sem diferenças quando nas análises múltiplas no grupo água ($4,324\pm 0,284$ mL/100g vs $3,787\pm 0,4297$ mL/100g, $P>0,9999$) como no grupo losartana ($5,408\pm 0,933$ mL/100g vs $3,334\pm 0,1303$ mL/100g, $P=0,0865$) quando comparado jejum com seu controle de ração *ad libitum* (Fig.17B).

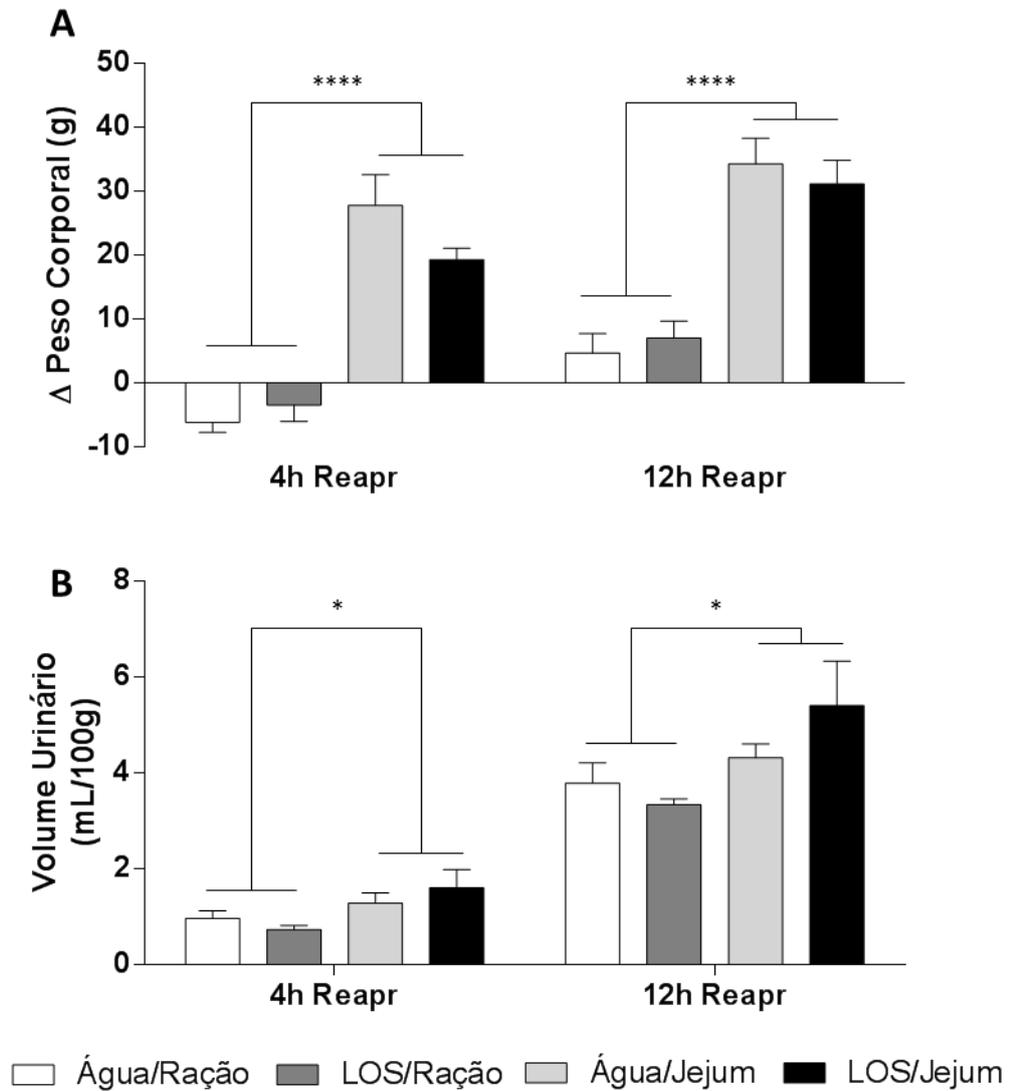


Figura 17. Variação de peso corporal e volume urinário na rerepresentação de água após 48h de privação alimentar em animais com acesso exclusivo a água ou a losartana na água de beber. O gráfico A mostra a variação de peso corporal (g) cumulativo nos tempos de 4h e 12h após a rerepresentação de ração de animais com acesso a água filtrada com e sem privação alimentar (grupos Água/Jejum e Água/Ração, respectivamente) e dos grupos com acesso exclusivo a solução de losartana como única fonte hídrica com e sem livre acesso a ração (grupos LOS/Ração e LOS/Ração, respectivamente). O gráfico B mostra o volume de excreção urinária padronizada pelo peso corporal expressa em mL/100g após 4h e 12h dos mesmos grupo. ANOVA de duas vias, e significância para o fator desafio; *P<0,05; **** P<0,0001.

5.5. Experimento V: Efeito da administração de angiotensina II e losartana intracerebroventricular em condições basais e após privação alimentar

5.5.1. Ingestão de ração e água após microinjeção i.c.v. em condições basais

Após a administração intracerebroventricular de losartana, ANG II ou do veículo, observamos efeito significativo do fator tempo ($F_{(5, 130)}=195,1$; $P<0,0001$), mas não do fator tratamento ($F_{(2, 26)}=2,515$; $P=0,1003$), com interação entre os fatores ($F_{(10, 130)}=1,97$; $P=0,042$) na ingestão de ração. Contudo, doze horas após a administração central é possível ver uma redução significativa entre o grupo losartana contra o grupo veículo ($P<0,0001$). Os dados encontram-se resumidos na tabela 3 e na figura 18A. No tempo de uma hora, não há diferença nos tratamentos testados sobre a ingestão cumulativa de ração ($F_{(2, 26)}=0,322$; $P=0,728$; Fig.18B).

Quanto à ingestão de água, há um claro e esperado efeito do tempo ($F_{(2, 130)}=181$; $P<0,0001$) e também do tratamento ($F_{(2, 26)}=7,212$; $P=0,0032$), mas sem interação entre os fatores ($F_{(10, 130)}=1,318$; $P=0,227$). Os valores de média de ingestão estão resumidos na tabela 4 e na figura 19A, onde é possível observar uma diminuição significativa da ingestão hídrica no grupo losartana apenas após 12h da administração central ($P=0,001$). Na figura 19B há representação da ingestão após 60 minutos do início do teste pela ANOVA de uma via, onde há efeito do tratamento ($F_{(2, 26)}=9,567$; $P=0,0008$), no qual os animais do grupo ANG II beberam mais água que o grupo veículo ($P=0,0022$). O efeito da ANG II na ingestão de água se inicia desde a primeira meia hora ($P<0,0001$) até a terceira hora ($P=0,0083$ e $P=0,023$ respectivamente para 120 e 180 minutos).

Tabela 3. Valores da ingestão de ração padronizada pelo peso corporal após microinjeção intracerebroventricular de angiotensina II ou losartana em condições basais

Tempo	Ingestão de ração padronizada (g/100g)		
	Veículo	Angiotensina II	Losartana
30'	0,5516 ± 0,1996	0,8198 ± 0,1598	0,6151 ± 0,259
60'	0,7489 ± 0,2218	0,9716 ± 0,1651	0,7867 ± 0,2397
120'	1,293 ± 0,2423	1,403 ± 0,2015	1,183 ± 0,2196
180'	2,402 ± 0,3184	2,679 ± 0,2634	1,830 ± 0,3049
240'	2,71 ± 0,3886	2,716 ± 0,253	1,992 ± 0,2957
720'	8,847 ± 0,9282	8,221 ± 0,4721	6,487 ± 2,511

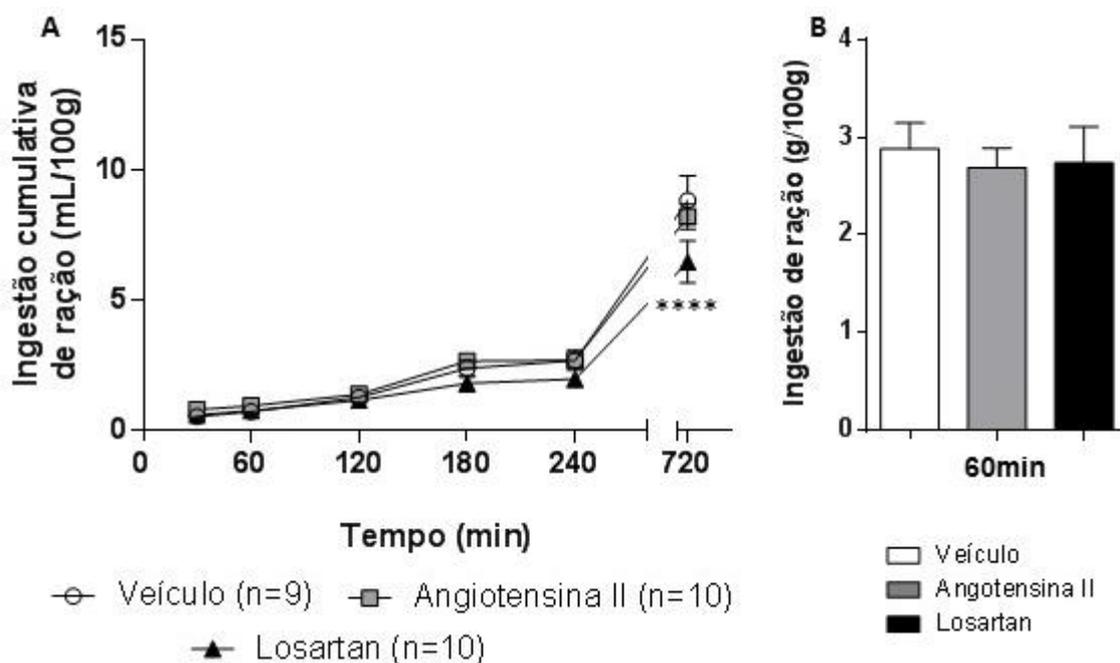


Figura 18. Ingestão de ração cumulativa após microinjeção intracerebroventricular de angiotensina II ou losartana em condições basais. A) Gráfico mostra os valores de ingestão de alimentos padronizado pelo peso corporal (g/100g) nos tempos de 30, 60, 120, 180, 240 e 720 minutos entre os grupos veículo (círculo aberto), angiotensina II (quadrado cinza) e losartana (triângulo preto) em condições basais de ingestão espontânea. Resultados das múltiplas comparações da ANOVA de duas vias avaliados em comparação com grupo veículo. B) Ingestão de ração cumulativa no tempo de uma hora após a microinjeção i.c.v. em condições basais de veículo (barra branca), ANG II (cinza) ou losartana (preta). ****P<0,0001 comparado ao controle.

Tabela 4. Valores da ingestão de água padronizada pelo peso corporal após microinjeção intracerebroventricular de angiotensina II ou losartana em condições basais

Tempo	Ingestão de água padronizada (mL/100g)		
	Veículo	Angiotensina II	Losartana
30'	0,2289 ± 0,1157	1,983 ± 0,3582	0,2010±0,1739
60'	0,6033 ± 0,2693	2,253 ± 0,3942	0,555±0,2536
120'	1,384 ± 0,43	3,165 ± 0,4412	1,006±0,311
180'	2,293 ± 0,4703	4,189 ± 0,534	1,739±0,4478
240'	3,301 ± 0,5489	4,486 ± 0,4336	2,41±0,6898
720'	13,82 ± 1,436	14,1 ± 1,43	10,32±1,49

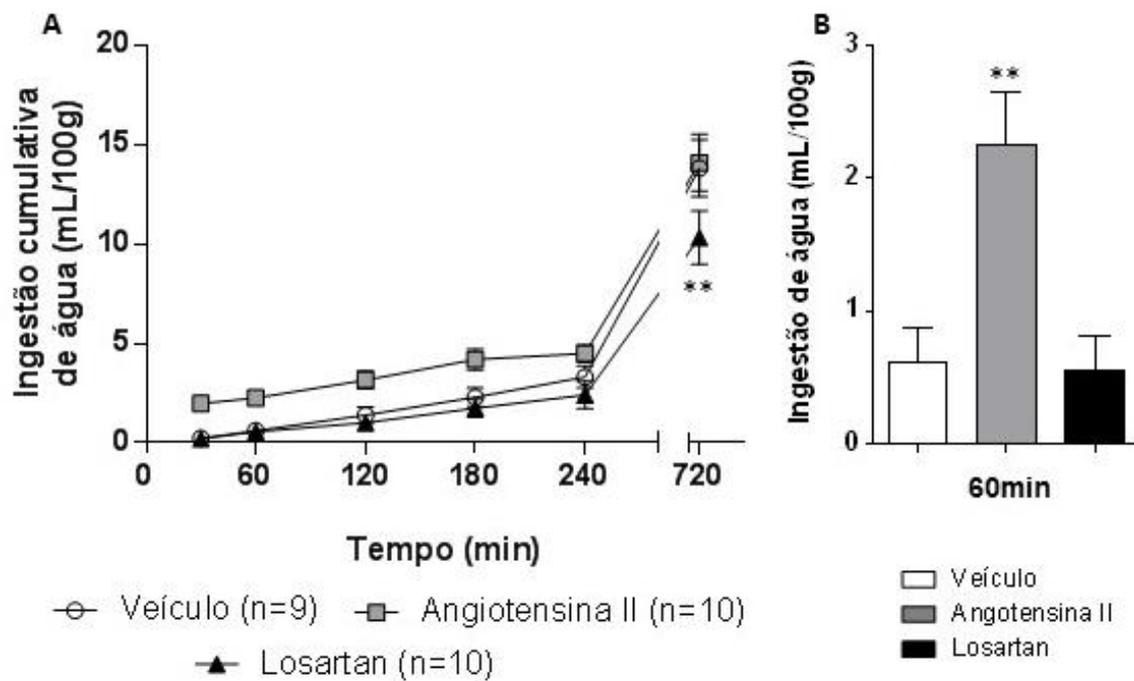


Figura 19. Ingestão de água cumulativa após microinjeção intracerebroventricular de angiotensina II ou losartana em condições basais. A) Gráfico mostra os valores de ingestão hídrica padronizado pelo peso corporal (mL/100g) nos tempos de 30, 60, 120, 180, 240 e 720 minutos entre os grupos veículo (círculo aberto), angiotensina II (quadrado cinza) e losartana (triângulo preto) em condições basais de ingestão espontânea. Resultados das múltiplas comparações da ANOVA de duas vias avaliados em comparação com grupo veículo. B) Ingestão de água cumulativa no tempo de uma hora após a microinjeção i.c.v. em condições basais de veículo (barra branca), ANG II (cinza) ou losartana (preta). **P<0,01 entre os grupos experimentais contra o controle.

5.5.2. *Ingestão de ração e de água após microinjeção i.c.v. depois de 48h de jejum*

Depois de passarem por jejum de 48h, de serem microinjetados com losartana ou ANG II, e de serem rerepresentados a comida, foi-se observado o comportamento de água e ração. Não há diferenças significativas com ANOVA de duas vias quanto à ingestão alimentar, onde há apenas variância no fator tempo ($F_{(5, 130)}=205,6$; $P<0,0001$) e não nos diferentes tratamentos ($F_{(2, 26)}=0,41$; $P=0,6658$), sem interação entre estes fatores ($F_{(10, 130)}=0,604$; $P=0,808$). Os dados referentes a estes experimentos estão representados na tabela 6 e na figura 20A. Dados representativos da ingestão alimentar após 60 minutos da reapresentação mostram que não há participação do tratamento de nenhuma das drogas na variância ($F_{(2, 26)}=0,147$; $P=0,864$; Fig.20B).

Quanto à ingestão de água após a reapresentação de ração do jejum, é possível observar mais interações entre os tratamentos, cujos valores médios estão resumidos na tabela 5. Primeiramente é importante relatar que houve influência tanto do fator tempo ($F_{(5, 130)}=232,2$; $P<0,0001$) quanto do fator tratamento ($F_{(2, 26)}=3,6$; $P=0,0416$) na variância, mas sem interação entre os fatores ($F_{(10, 130)}=0,9162$; $P=5205$). Nas múltiplas análises, há diferença do grupo que recebeu losartana comparado ao controle ($P=0,036$) apenas após 12h. Na primeira meia hora há apenas uma tendência de diferença entre ANG II e o controle ($P=0,0567$), mas com uma hora essa diferença torna-se significativa estatisticamente ($P=0,0411$). Depois não há mais alterações significativas (Fig.21A). Analisada apenas a ingestão cumulativa da primeira hora ($F_{(2, 26)}=0,115$; $P=0,0003$), observa-se que a diferença sugerida é demonstrada pelo pós-teste ($P=0,0019$) (Fig.21B).

5.5.3. *Variação do peso corporal em condições basal e após privação de 48h*

Em condições basais, a variação de peso corporal após quatro horas da microinjeção i.c.v. de ANG II ou losartana indica uma participação desta manipulação central na variância ($F_{(2, 26)}=3,522$; $P=0,0443$), embora tenha sido observado apenas uma tendência de diminuição quando comparado o grupo losartana com o ANG II [$-2,2\pm 3,502$ g (n=10) vs $8,3\pm 2,517$ g (n=9), $P=0,0552$], mas não há diferença entre veículo e ANG II [$6,222\pm 2,866$ g (n=9) vs $8,3\pm 2,517$ g (n=10), $P>0,9999$] e entre veículo e losartana [$6,222\pm 2,866$ g (n=9) vs $-2,2\pm 3,502$ g (n=10), $P=0,181$]. Após 12h de microinjeção, o tratamento já não tem mais efeito na variação de peso corporal ($F_{(2, 26)}=1,88$; $P=0,173$), tampouco há diferença veículo e losartana [$15,22\pm 4,126$ g (n=9) vs $1,5\pm 5,576$ g (n=10), $P=0,194$] e entre veículo e ANG II [$15,22\pm 4,126$ g (n=9) vs $9,1\pm 4,946$ g (n=10), $P>0,9999$] (Fig.22A).

Após jejum de 48h e reapresentação de ração, não é observada efeito do tratamento sobre a variância ($F_{(2, 26)}=0,5902$; $P=0,561$) da alteração no peso corporal nem às 4h entre os grupos veículo e ANG II [$26\pm 2,058$ g (n=11) vs $22,7\pm 3,67$ g (n=10), $P>0,9999$], veículo e losartana [$26\pm 2,058$ g (n=11) vs $27,63\pm 3,968$ g (n=8), $P>0,9999$], nem após 12h de reapresentação e microinjeção tanto na variância ($F_{(2, 26)}=0,328$; $P=0,723$) como entre os grupos controle e ANG II [$32,64\pm 6,552$ g (n=11) vs $27\pm 4,378$ g (n=10), $P>0,9999$] e losartana [$32,64\pm 6,552$ g (n=11) vs $28,63\pm 2,471$ g (n=8), $P>0,9999$] (Fig.22B).

Tabela 5. Valores da ingestão de ração padronizada pelo peso corporal após microinjeção intracerebroventricular de angiotensina II ou losartana depois de reapresentação de comida após 48h de jejum

Tempo	Ingestão de ração padronizada (g/100g)		
	Veículo	Angiotensina II	Losartana
30'	1,633 ± 0,1205	1,605 ± 0,1618	1,4 ± 0,206
60'	2,883 ± 0,2634	2,689 ± 0,1992	2,738 ± 0,3673
120'	3,258 ± 0,2711	3,115 ± 0,2913	3,414 ± 0,4318
180'	3,616 ± 0,2235	3,401 ± 0,3217	4,071 ± 0,4858
240'	4,334 ± 0,2173	3,586 ± 0,4125	4,411 ± 0,49
720'	8,612 ± 0,7057	8,038 ± 0,6818	8,424 ± 0,5799

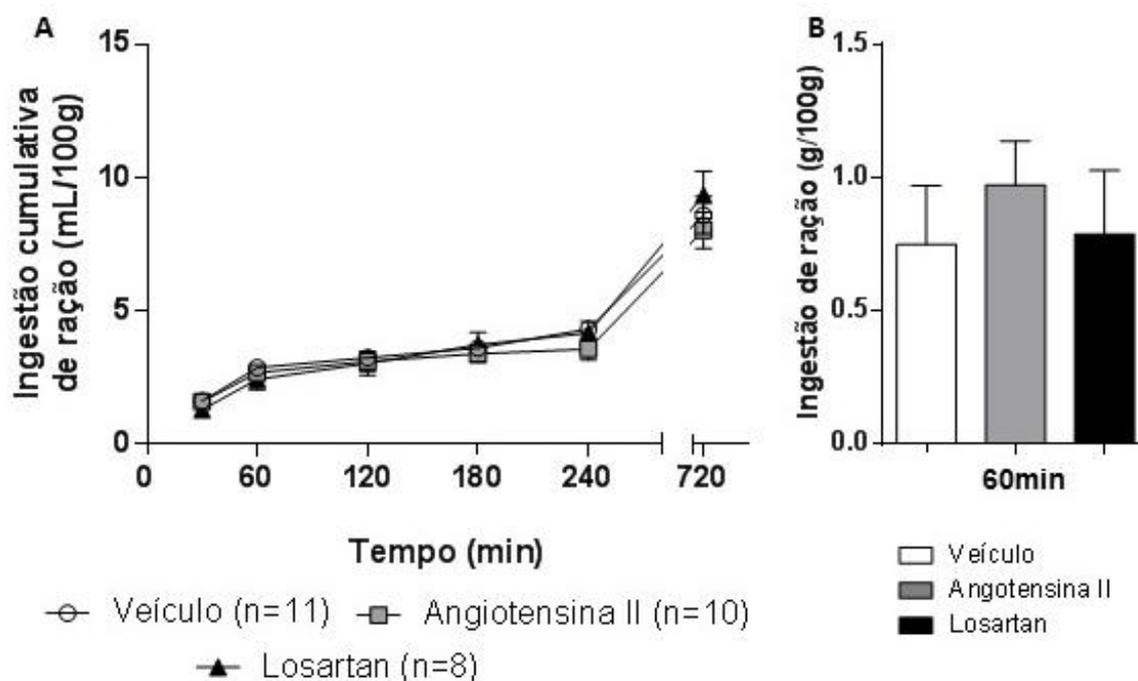


Figura 20. Ingestão de ração cumulativa após microinjeção intracerebroventricular de angiotensina II ou losartana após 48h de jejum. Gráfico A mostra os valores de ingestão alimentar padronizado pelo peso corporal (g/100g) nos tempos de 30, 60, 120, 180, 240 e 720 minutos entre os grupos veículo (círculo aberto), angiotensina II (quadrado cinza) e losartana (triângulo preto) na reapresentação de ração após 48h de jejum. Resultados das múltiplas comparações da ANOVA de duas vias avaliados em comparação com grupo veículo. B) Ingestão de água cumulativa no tempo de uma hora após a microinjeção i.c.v. após 48h de jejum de veículo (barra branca), ANG II (cinza) ou losartana (preta).

Tabela 6. Valores da ingestão de água padronizada pelo peso corporal após microinjeção intracerebroventricular de angiotensina II ou losartana depois de reapresentação de comida após 48h de jejum

Tempo	Ingestão de água padronizada (mL/100g)		
	Veículo	Angiotensina II	Losartana
30'	2,71 ± 0,3475	5,416 ± 0,5411	1,501 ± 0,4573
60'	4,845 ± 0,6175	7,706 ± 0,4145	4,22 ± 0,5469
120'	6,712 ± 0,7106	8,204 ± 0,4987	5,766 ± 0,715
180'	7,71 ± 0,6687	9,146 ± 0,5819	6,985 ± 1,037
240'	9,293 ± 0,6927	9,803 ± 0,7601	8,63 ± 0,9276
720'	21,31 ± 1,733	21,33 ± 1,715	19,54 ± 1,346

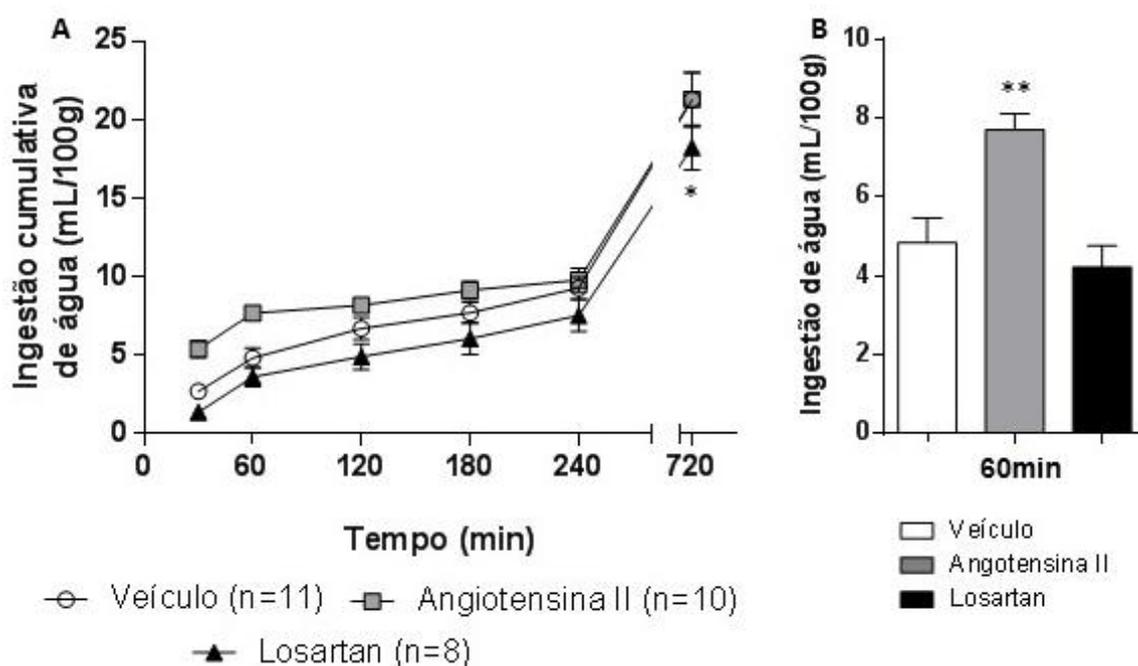


Figura 21. Ingestão de água cumulativa após microinjeção intracerebroventricular de angiotensina II ou losartana após 48h de jejum. Gráfico A mostra os valores de ingestão hídrica padronizado pelo peso corporal (mL/100g) nos tempos de 30, 60, 120, 180, 240 e 720 minutos entre os grupos veículo (círculo aberto), angiotensina II (quadrado cinza) e losartana (triângulo preto) na reapresentação de ração após 48h de jejum. Resultados das múltiplas comparações da ANOVA de duas vias avaliados em comparação com grupo veículo. B) Ingestão de água cumulativa no tempo de uma hora após a microinjeção i.c.v. após 48h de jejum de veículo (barra branca), ANG II (cinza) ou losartana (preta). *P<0,05; **P<0,01 entre os grupos experimentais contra o controle.

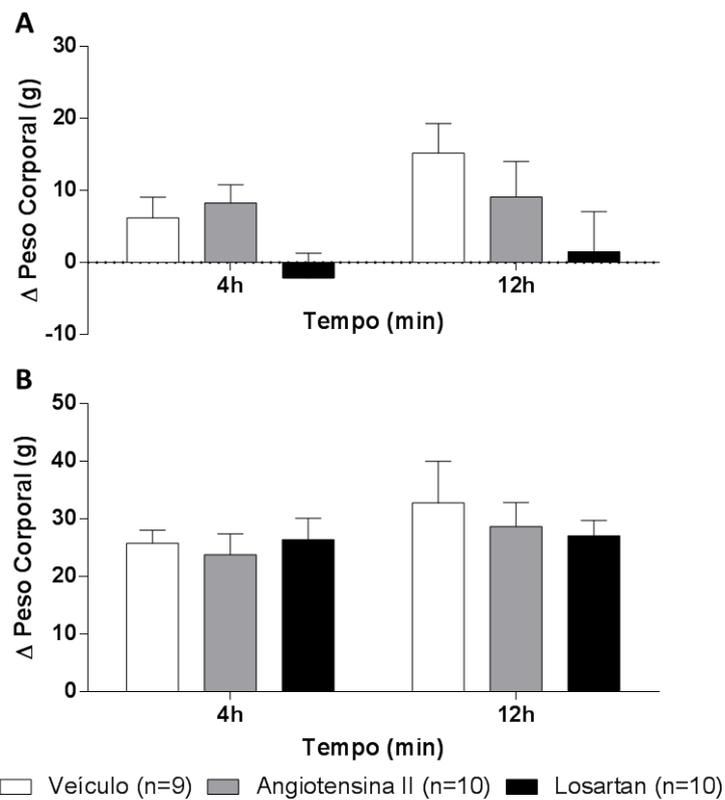


Figura 22. Peso corporal 4h e 12h após microinjeção intracerebroventricular injeção de angiotensina II e losartana em condições basais e após 48h de privação alimentar. Gráficos mostram os dados de variação de peso corporal cumulativo após 4h e 12h de microinjeção intracerebrovetricular de veículo (branco), angiotensina II (cinza) e losartana (preto) em condições basal (A) e depois de 48h de jejum (B).

6. DISCUSSÃO

O SFO é uma importante região para integração de sinais das mais diversas naturezas, incluindo metabólicos, cardiovascular e hidroeletrolíticos. Quanto ao controle autonômico e neuroendócrino do SFO, a ANG II tem participação importante neste núcleo. A integração entre ANG II e hormônios com claros efeitos metabólicos no SFO já havia sido descrita por Cancelliere e Ferguson (2017), que observaram também que quanto maior concentração de glicose onde neurônios do SFO são cultivados e testados, maior a proporção de neurônios responsivos a ANG II. Na ocasião, a hipótese deles foi que os níveis de glicose alteravam a expressão de receptores AT₁. Nossos dados mostram que não há diferenças significativas na expressão de mRNA para receptores AT_{1a} nas células do SFO incubados em diferentes concentrações de glicose por até 24h, e a única diferença observada foi uma diminuição na expressão de mRNA para AT_{1a} após 6h e 24h nos três períodos em que avaliamos (1h, 6h e 24h). É importante ressaltar que os resultados de RT-qPCR indicam alteração na expressão de mRNA para os receptores AT_{1a} e, embora a expressão de mRNA esteja alta na primeira hora, não quer dizer, necessariamente, que haja uma diminuição na expressão de AT_{1a} nas células do SFO depois de 24h. A expressão de mRNA pode indicar a expressão da proteína de fato em muitos casos (ÖSTLUND; SONNHAMMER, 2012), mas por se tratar de um experimento *in vitro* com outros fatores relacionados à técnica podem afetar esta expressão. Esta elevada expressão de AT_{1a} na primeira hora pode ser devido a adaptação das células ao novo ambiente.

Outro possível alvo para ação da ANG II seriam os receptores AT₂, que estão implicados em alguns mecanismos pelos quais a ANG II pode afetar a ingestão de alimentos. Infusão i.c.v. de um antagonista AT₂ após 24h de privação alimentar diminuiu a ingestão de alimentos comparado aos grupos veículo e losartana, reforçando o papel deste receptor na ingestão alimentar depois de períodos de jejum em ratos (WEISINGER *et al.*, 1997). O receptor AT₂ não é detectável no SFO de ratos (JOHREN; INAGAMI; SAAVEDRA, 1995; LENKEI *et al.*, 1997), inclusive nós mesmo falhamos em detectar seu mRNA (dados não mostrados) em células dissociadas do SFO. Este receptor angiotensinérgico foi reportado estar presente em neurônios de SFO de camundongos, mesmo que em baixos níveis (DE KLOET *et al.*, 2016). Os efeitos do bloqueio AT₂ i.c.v. podem estar relacionados também a outras regiões encefálicas que não o SFO. Entretanto, a relevância dos receptores AT₂ nas células do SFO integrando respostas a ANG II circulante e o estado metabólico do animal permanecem um interessante alvo de estudo, especialmente quando este receptor já foi implicado com parte da resposta das células do SFO a ANG II (ONO; HONDA; INENAGA, 2001).

Investigamos também se neurônios sensíveis à glicose também são sensíveis a ANG II. Observamos que os neurônios do SFO que respondem a ANG II podem também perceber alterações de glicose do meio onde estão sendo registrados. Entretanto, não há correlação entre a responsividade a ANG II e qualquer um dos três fenótipos de glicossensibilidade, podendo estes neurônios ser tanto GE, GI ou nGS. Inclusive, entre os neurônios que respondiam a ANG II, a proporção dos fenótipos de glicossensibilidade foram similar àquela já reportada na literatura: 50% nGS, 25% GE e 25% GI (MEDEIROS; DAI; FERGUSON, 2012). Ao testar a resposta de um mesmo neurônio do SFO a ANG II em duas diferentes concentrações de glicose, observamos que alguns neurônios que não respondiam em 5mM de glicose passam a responder a ANG II a 10mM. Esta observação de um mesmo neurônio apresentar diferentes respostas a ANG II dependendo da concentração de glicose parecem ter

mais relação com alterações glicêmicas agudas influenciando o potencial de membrana. Alguns mecanismos responsáveis por glicossensibilidade em diversas células que apresentam relação com os mecanismos de sinalização da ANG II. Um importante mecanismo de glicossensibilidade inclui a expressão dos canais K_{ATP} , (BURDAKOV; LUCKMAN; VERKHRATSKY, 2005), tendo sido implicados como responsáveis pelo mecanismo de glicossensibilidade pelo menos de neurônios GI do SFO (MEDEIROS; DAI; FERGUSON, 2012). Na musculatura lisa vascular, um possível mecanismo pelo qual a ANG II induz vasoconstrição é a inibição de canais K_{ATP} , e poderia ser mediado por estímulo da proteína quinase C (PKC) (KUBO; QUAYLE; STANDEN, 1997) e fosfolipase C (PLC) e inibição da proteína quinase A (PKA) (HAYABUCHI; DAVIES; STANDEN, 2001) causada pela ativação de receptores AT_1 . Outra possibilidade de glicossensibilidade é o cotransportador sódio-glicose (SGLT, do inglês *sodium-glucose transporter*) (BURDAKOV; LUCKMAN; VERKHRATSKY, 2005). Estes transportadores de membrana classicamente conhecidos por sua participação na reabsorção de glicose nos túbulos proximais, onde a expressão do subtipo SGLT2 pode ser estimulada pela ANG II (BAUTISTA *et al.*, 2004). SGLT também estão presentes no SNC (YU *et al.*, 2010) e, no hipotálamo, um subtipo específico do transportador, o SGLT3 é descrito como uma forma de glicossensibilidade (O'MALLEY *et al.*, 2006). Diferente dos demais transportadores da mesma família, o SGLT3 atua mais como um receptor para glicose do que um transportador (DIEZ-SAMPEDRO *et al.*, 2003), e tem sido implicado em algumas disfunções metabólicas do SNC como mal de Alzheimer por exemplo (SCHEEPERS; JOOST; SCHÜRMAN, 2015). Qual dessas vias é responsável pela glicossensibilidade no SFO e que podem estar alteradas nas diferentes concentrações de glicose provocando a resposta dual a ANG II observada permanece um questionamento a ser explorado em estudos futuros.

Ainda sobre a resposta dual à ANG II mostrada no último protocolo da eletrofisiologia pela técnica de *patch clamp*, há uma importante observação acerca de muitos estudos *in vitro* em neurônios do SFO: tanto em células dissociadas quanto em fatias, usam uma concentração de glicose de 10mM ou maior em seus experimentos (LI; FERGUSON, 1993a; RAUCH *et al.*, 1997; SCHMID; SIMON, 1992; WANG *et al.*, 2004). A concentração de glicose plasmática varia entre 5,0mM a 5,5mM (90mg/dL a 100mg/dL) em condições basais tanto no modelo experimental de rato (ALPONTI; SILVEIRA, 2009) e humanos (TABÁK *et al.*, 2009). O SFO é capaz de perceber alterações da concentração de glicose diretamente do sangue, já que é desprovido de BHE. Assim, a alta concentração de glicose usada nos estudos prévios pode influenciar tanto a população de canais, como a resistência de entrada e o potencial de membrana da célula. Esta discrepância pode ser ainda maior em experimentos com fatias cerebrais, registrando células presentes em regiões que, no animal vivo, são banhados apenas por líquido cefalorraquidiano, onde a concentração de glicose é mantida pelo plexo coroide em cerca de 50% a 60% da glicemia (HOCHWALD; MAGEE; FERGUSON, 1985). Com isso, além da possibilidade de alteração fisiológica da resposta de neurônios do SFO a ANG II dependendo da glicemia, nossos dados também apontam um possível problema na superestimação de resultados eletrofisiológicos que usam concentrações muito elevadas de glicose para registro da atividade elétrica destes neurônios.

Baseados nas observações até o momento e na ausência de estudos mais aprofundados da participação do SRA em condições de baixa oferta energética na ingestão de água e comida, decidimos avaliar os efeitos da privação alimentar no animal inteiro.

Há um componente de estresse envolvido neste período de jejum, que é evidenciado pelo aumento da corticosterona plasmática, mesmo que não seja possível observar aumento de AVP. Estudos prévios mostram que a privação alimentar de 48 horas é capaz de evocar efeito

similar de aumento da corticosterona sem alteração do AVP em camundongos, como o aumento da expressão de mRNA de CRH no PVN (YADAWA; CHATURVEDI, 2016), e aumento de noradrenalina, adrenalina, dopamina, corticosterona e ACTH plasmáticos em ratos após 40h de jejum (KISS; JEZOVA; AGUILERA, 1994).

No jejum, há também um aumento nos níveis plasmáticos de ANG I e II desde as primeiras 24h. Alguns fatores podem levar a este aumento, desde o fato de os animais beberem menos água e apresentarem diminuição do volume do líquido extracelular, ou por ativação simpática do estresse da privação alimentar (KRAUSE *et al.*, 2011; MECAWI *et al.*, 2015). Ora, a ANG II, aumentada desde as primeiras 24h de jejum, tem relação com o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), já que ANG II estimula diretamente a secreção de CRH (SUMITOMO *et al.*, 1991), estimula a secreção de glicocorticoides atuando diretamente no córtex adrenal (GIACCHETTI *et al.*, 1996) ou via estímulo da atividade simpática sobre a adrenal (NAKAMURA *et al.*, 2015) e estimula a secreção hipotalâmica de AVP (FERGUSON; RENAUD, 1986), que é um importante secretagogo de ACTH na adeno-hipófise (LUTZ-BUCHER *et al.*, 1980). Isso poderia explicar o aumento da corticosterona observado.

Hindmarch e colaboradores (2008), usando a análise de transcriptoma, observaram que a privação alimentar de 48h altera a expressão de receptores AT₁ no SFO de ratos. Aqui nós confirmamos estes resultados por meio de RT-qPCR, observando um aumento de cinco vezes na expressão de mRNA para os receptores AT₁ no SFO, mas também expandimos o mesmo avaliando a expressão deste receptor com 24h de jejum. Observamos então que nas primeiras 24 horas de privação alimentar, não há aumento na expressão de receptores AT₁ no SFO.

Ainda durante jejum de 48h, a glicemia tem queda progressiva proporcionada pela ausência de aporte energético pela alimentação. Sendo assim, o jejum é uma condição que causa hipoglicemia e aumento dos receptores AT_{1a} no SFO. O aumento da expressão do receptor AT_{1a} pode ser um mecanismo de defesa do organismo para garantir que, em uma condição de baixa concentração de glicose na qual os neurônios do SFO tendem a responder menos a ANG II (CANCELLIERE; FERGUSON, 2017), este OCV possa continuar a exercer uma resposta adequada à ANG II circulante. Agora o que leva a este aumento de AT_{1a} pode não ser a hipoglicemia, já que mostramos que uma concentração extremamente baixa de glicose (1mM ou 18mg/dL) não altera a expressão de AT₁. Uma possibilidade para este aumento é a própria ANG II plasmática levando ao aumento da expressão de AT₁ no SFO, já que o SRA está mais ativado desde as 24 primeiras horas de privação alimentar, mas o aumento da expressão de AT₁ no SFO só começa a ser observada a 48h.

De fato, a superativação de receptores AT₁ é capaz de levar a ativação de mecanismos para sua dessensibilização e internalização (FENG *et al.*, 2005). Receptores acoplados a proteína G, como o receptor AT₁, quando ativados levam a desacoplação da proteína G, o que expõe seu sítio intracelular carboxiterminal que é fosforilado. Essa modificação pós-traducional, além de reduzir a possibilidade de reacoplamento com a proteína G, serve de sinal para que proteínas como β -arrestinas marquem estes receptores para serem internalizados (FERGUSON, 2001). Estes receptores podem ficar em endossomos até serem “ressensibilizados” e levados de volta à superfície. Esta é uma das formas de o organismo evitar a superativação do receptor, e isso pode levar a uma diminuição da expressão de receptores AT₁ na membrana de células do SFO num primeiro momento. Entretanto, a ativação de receptores AT₁, além da clássica via que depende da proteína G_q, pode ativar também a via das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), que está implicada no aumento da expressão de receptores AT₁ (ANSAR *et al.*, 2013). A via das MAPK pode ser ativada não apenas pela ativação do receptor, como também pela própria internalização do

receptor AT₁, causado pela sua superativação (COSTA-NETO *et al.*, 2014; FENG *et al.*, 2005). A ANG II aumentada em algumas condições como administração crônica de ANG II ou hipertensão induzida pelo modelo dois rins e um clipe é capaz de aumentar a expressão de AT₁ em alguns territórios vasculares específicos como glomérulos ou túbulos proximais renais (DOUGLAS, 1987; HARRISON-BERNARD *et al.*, 2018). Também a nível de SNC a ANG II pode levar ao aumento no mRNA para AT₁, incluindo no SFO, o que encontra suporte na literatura, já que a ANG II aumenta a expressão de AT₁ no SNC de ratos, incluindo no SFO (MOELLENHOFF *et al.*, 2001; PORCARI *et al.*, 2019; PORTER, 1999). Desafios que levam ao aumento da ANG II plasmática como privação hídrica (BARTH; GERSTBERGER, 1999; GREENWOOD *et al.*, 2015) também levam a este aumento de AT_{1a}. Aumento da expressão de AT_{1a} não foi observado nos nossos experimentos *in vitro* apenas pela condição que emulava hipoglicemia (1mM de glicose), o que pode reforçar o papel na ANG II, em detrimento da concentração de glicose, na modulação da expressão de AT_{1a} no SFO. Talvez a cultura com diferentes concentrações de ANG II sirva para trazer ainda mais força a esta hipótese da ANG II estimulando o aumento da expressão de AT₁ no SFO. A partir destas observações, buscamos avaliar como a privação alimentar afeta o comportamento de ingestão hídrica e se o bloqueio de receptores AT₁ pode de alguma forma alterar o comportamento de ingestão de água e ração. Experimentos com privação alimentar e o SRA são menos comuns, e, no geral, mais antigos, sendo, muitas vezes, baseados nas observações de que, em diversas espécies, os indivíduos comem menos quando são privados de água, por processo de origem central para promover a conservação de fluidos corporais (MCFARLAND; ROLLS, 1972). Já foi mostrado que a administração intracerebroventricular de ANG II estimula a ingestão de água mais rápido do que inibe a fome em ratos mantidos em jejum por 24h (MCFARLAND; ROLLS, 1972). Ainda, a administração de ANG II na área pré-óptica lateral reduziu a ingestão de alimentos após o jejum em animais hiper-hidratados (ROLLS; MCFARLAND, 1973). Após quatro dias de privação alimentar, a administração intraperitoneal de isoproterenol (um agonista β-adrenérgico capaz de aumentar a atividade do SRA por estimular a secreção de renina) aumenta a ingestão de água em uma hora em ratos, quando comparados ao controle, mas sem alterar a ingestão de alimentos (YEH; BAKER; KATOVICH, 1986). Depois, foi-se mostrado que o bloqueio central dos receptores AT₂ pelo antagonista PD-123319 em ratos jejuados por 24h só leva a diminuição na ingestão de água, e não de alimentos depois de uma hora de consumo (ROWLAND; FREGLY, 1993). Resultado similar seria descrito mais tarde, também depois de 24h de jejum, com losartana diminuindo a ingestão cumulativa de água mas não de comida duas horas depois da reapresentação (WEISINGER *et al.*, 1997). Em 2006, estudos com camundongos transgênicos *knock-out* para o receptor AT₂ permitiram hipotetizar uma participação deste receptor no equilíbrio metabólico que seriam importantes mecanismos de adaptação do organismo frente a momentos de falta de alimentos, já que nos animais sem o receptor a perda de peso foi atenuada com a privação alimentar (YVAN-CHARVET *et al.*, 2006).

Em nosso protocolo, a privação de alimentos por 48h levou a uma queda no peso corporal, da ingestão de fluidos e do volume urinário, culminando na redução do volume do líquido extracelular, mostrada pelo aumento do hematócrito. Entretanto, o tratamento com losartana não foi capaz de alterar estes efeitos. A ingestão de fluidos reduzida é compatível com achados prévios da literatura (KISS; JEZOVA; AGUILERA, 1994) e muito se deve a não ingestão de alimentos, já que muitas vezes a ingestão hídrica é um reflexo da ingestão alimentar, que é um estímulo para a sede (KRALY *et al.*, 1995). A ingestão diária de alimentos nos animais que não foram submetidos ao jejum também não teve influência do tratamento subcrônico com losartana na água de beber durante as 48h, indicando que o bloqueio AT₁ sistêmico pode não exercer efeitos na ingestão alimentar de animais com acesso

livre a ração padrão, o que é compatível com dados prévios da literatura (SMITH *et al.*, 2014).

Em relação a glicemia, observamos que o bloqueio de receptores AT₁ atenuou esta queda à da concentração de glicose entre 24 e 48h de jejum. O SRA tem efeito em diferentes níveis de controle da glicemia, agindo desde a secreção de hormônios pancreático até influenciando a sensibilidade a estes hormônios.

O pâncreas é um importante órgão endócrino, com papel fundamental no controle do balanço energético pela secreção de hormônios como insulina e glucagon. E tal qual o tecido adiposo, o pâncreas também apresenta todos os principais componentes do SRA atuando de forma local para controle de seu funcionamento (GRAUS-NUNES; SOUZA-MELLO, 2019; LEUNG; CHAPPELL, 2003). As ilhotas pancreáticas (estruturas que concatenam a importante função endócrina do órgão) apresentam angiotensinogênio nas células- α (REGOLI *et al.*, 2003), ECA e ECA-2 na periferia das ilhotas e em sua microvasculatura (TIKELLIS *et al.*, 2004), e os receptores AT₁ e AT₂ respectivamente nas células- β e δ (GRAUS-NUNES; SOUZA-MELLO, 2019; TIKELLIS *et al.*, 2004). A resistência à insulina, como a que ocorre no *diabetes mellitus* do tipo 2 por exemplo, leva a hipertrofia das células- β e aumenta a expressão de receptores AT₁ nas mesmas, o que reduz o fluxo sanguíneo às ilhotas e diminui a secreção de insulina (LEUNG, 2007), além de aumentar o estresse oxidativo e favorecer a apoptose (KIKUMOTO *et al.*, 2010; LUPI *et al.*, 2006). Antagonistas de receptores AT₁ como losartana são capazes de diminuir a hipertrofia das ilhotas pancreáticas e aumentar a vascularização insular em camundongos obesos com dieta hipercalórica, muito porque o bloqueio AT₁ favorece a via ECA-2/ANG(1-7)/Mas (GRAUS-NUNES *et al.*, 2017). A ANG(1-7) atuando em seus receptores Mas promove a função da célula- β pancreática por aumentar o segundo mensageiro cAMP, que modula vias de amplificação acessórias para liberação de insulina que não tem necessariamente relação com a secreção clássica de insulina mediada por glicose (SAHR *et al.*, 2016). Perifericamente, a ANG II e seu receptor AT₁ parecem exercer alguns outros efeitos não relacionados necessariamente com a secreção de insulina, mas sim com sua sensibilidade. Uma forma como a ANG II ou os bloqueadores AT₁ podem inferir na ingestão alimentar é via PPAR- γ . Antagonistas AT₁ atuando direta ou indiretamente por receptores PPAR- γ (REID, 2005), levam à diminuição do peso corporal (HE *et al.*, 2010) e aumenta a sensibilidade a insulina tanto em animais hipertensos (MÜLLER-FIELITZ *et al.*, 2012) como em não hipertensos (SCHUSTER *et al.*, 2018).

No jejum, alguns sistemas hormonais encontram-se ativados para garantir a homeostase energética (PETERSEN; VATNER; SHULMAN, 2017). Um importante mecanismo para aumentar a glicemia consiste na produção de novas moléculas de glicose a partir de outros precursores orgânicos, a gliconeogênese (HATTING *et al.*, 2018). Alguns tecidos apresentam a maquinaria celular necessária para gliconeogênese, incluindo os rins. Entretanto, o principal órgão capaz de realizar este processo bioquímico a nível sistêmico é o fígado (PETERSEN; VATNER; SHULMAN, 2017). A ANG II também pode atuar diretamente tecido hepático. Receptores AT₁ também estão presentes no fígado e se encontram aumentados em situações patológicas, como esteatose e fibrose (BATALLER *et al.*, 2005), tanto que iECA e ARB demonstram atividade de diminuir estas lesões (TOBLLI *et al.*, 2008). Ainda, a ANG II via receptores AT₁ é relacionada com a ativação da gliconeogênese renal partilhando de vias comuns ao glucagon de ativação de MAPK nas células mesangiais dos glomérulos (LI; CARRETERO; ZHUO, 2006). O que observamos, entretanto, foi o a losartana atenuando a queda da glicemia, sugerindo uma mobilização de glicose. Pode ser que, neste caso, a ANG II esteja atuando por outras vias, aumentando a gliconeogênese. Os estímulos hormonais para gliconeogênese incluem o glucagon, catecolaminas e glicocorticoides (PETERSEN;

VATNER; SHULMAN, 2017). O glucagon é hormônio peptídico produzido nas células- α pancreática, que tem como principal estímulo para sua secreção a diminuição da glicemia (MÜLLER *et al.*, 2017). A ANG II é capaz de levar ao aumento na concentração plasmática de glucagon, mas por vias indiretas, sem estimular diretamente as células- α (MILDNER *et al.*, 2017). Uma possível via indireta que a ANG II participa que pode levar a essa secreção de glucagon é a ativação do SNS, já que as células- α respondem ao estímulo α_1 e β -adrenérgico (VIEIRA; LIU; GYLFE, 2004). Outro estímulo para mobilização de glicose é a ativação do eixo HHA, incluindo a participação de catecolaminas (BARTH *et al.*, 2007) e dos glicocorticoides, como a corticosterona (KUO *et al.*, 2015). A corticosterna está aumentada no jejum, como mostra nosso modelo experimental, bem como há aumento das catecolaminas (BALI; JAGGI, 2013). O bloqueio AT₁ é capaz de diminuir a atividade do eixo HHA, podendo assim, diminuir esta atividade sobre o metabolismo (KRAUSE *et al.*, 2011), podendo este ser o motivo mais provável das nossas observações do efeito da losartana na glicemia.

Na reapresentação de comida, o que se observou foi que os animais com losartana advindos do jejum bebem menos água nos primeiros 60 minutos, e isto é parte dos efeitos do bloqueio dos receptores AT₁ na ingestão hídrica. Esta observação sugere que o bloqueio AT₁ é capaz de causar diminuição da ingestão de água relacionada a alimentação neste curto período pós-reapresentação. Depois a ingestão hídrica e de comida se estabiliza nos próximos tempos e isso pode ser pelo fato de os animais que estavam jejuados terem comido bastante e ativado outros mecanismos de sede que nosso tratamento com losartana em baixas doses não foi capaz de alterar.

Num outro protocolo *in vivo*, foi avaliado o efeito da administração i.c.v. de losartana ou ANG II em animais alimentados e após 48h de jejum. Como esperado, houve um claro efeito da ANG II aumentando agudamente a ingestão de água, tanto no basal com após o jejum, reforçando um dos mais clássicos efeitos deste hormônio sobre o SNC (SIMPSON; EPSTEIN; CAMARDO, 1978). Entretanto, a administração de ANG II i.c.v. *in bolus* não alterou a ingestão de ração em condições basais ou após jejum de 48h. Por outro lado, o tratamento com losartana i.c.v. foi capaz de diminuir a ingestão de água e de comida em condições basais 12 horas após a administração. A aparição dos efeitos da losartana i.c.v. terem sido mais tardios podem ser devido à sua meia vida ser de cerca de 2 horas (SICA; GEHR; GHOSH, 2005), e, com isso, permanecer mais tempo exercendo seu efeito na ingestão cumulativa.

Na reapresentação de ração após o jejum, o único efeito observado foi da losartana diminuindo a ingestão hídrica cumulativa depois de 12h da reapresentação de ração, sem efeito significativo sobre a ingestão alimentar, reforçando este o efeito do SRA controlando a ingestão de água perante a alimentação. Novamente, pode ter o efeito previamente comentado da ação mais prolongada da losartana. Mas ainda, o estímulo de fome evocado por 48h de privação alimentar pode ter sido muito intenso, evocando mecanismos orexigênicos de maior importância no controle da ingestão alimentar (PERELLO; STUART; NILLNI, 2007; VAN DEN TOP *et al.*, 2017). Quanto ao peso corporal, apenas há diferença no basal entre os grupos losartana e ANG II após 4h da microinjeção central, que pode ser devido ao maior consumo de água dos animais que receberam ANG II, que eleva o peso corporal. Estes efeitos, inclusive, são passageiros e não são mais observados após 12h, que pode ser devido ao curto efeito que a ANG II apresentou, já que sua meia vida é bastante curta, de menos de 20 segundos (CHAMPMAN; BOOKS; MUNDAY, 1980). Isso parece ir de encontro ao exposto na revisão bibliográfica, onde o efeito da ANG II sobre o peso corporal, quando observado, tende à diminuição, mas é importante salientar que este efeito ocorre

principalmente em administrações contínuas centrais (PORTER; POTRATZ, 2004) ou periféricas (CASSIS *et al.*, 1998). Apenas em camundongos a administração de ANG II i.c.v. foi capaz de diminuir o peso corporal quando *in bolus* (NAKANO-TATENO *et al.*, 2012).

Os estímulos de fome e sede podem ser difíceis de ser separados, bem como eles podem mutualmente estimular e inibir uns aos outros (YOSTEN; SAMSON, 2014). Uma das formas pela qual a interação entre fome e sede envolvendo o SRA se dá pode ser pela osmolaridade e eletrólitos, não só após ganharem a corrente sanguínea depois de absorvidos, mas no próprio trato gastrointestinal (TGI). A ingestão de comida, especialmente a ração seca oferecida aos animais experimentais, desloca grande quantidade de fluidos corporais para o TGI (LEPKOVSKY *et al.*, 1957; WEISINGER *et al.*, 1997), o que pode resultar num déficit de fluidos celular e extracelular. Esta hipovolemia pós-prandial pode levar a estímulo para ingestão de água via sistema nervoso autônomo, com ativação de receptores de estiramento no sistema circulatório (FITZSIMONS, 1980; MECAWI *et al.*, 2015), bem como também pela ativação do SRA (KRALY, 1984; KRALY; CORNEILSON, 1990). Isso poderia explicar o comportamento de busca por água após a ingestão de alimentos, que nos casos dos nossos animais, é ração seca farelada. Esse fenômeno pode inclusive ser antecipado via SFO pela influência da passagem do alimento pela cavidade oral, ainda que a participação da ANG II no SFO não tenha sido investigada especificamente neste caso (ZIMMERMAN *et al.*, 2016).

Estes efeitos físicos de mobilização de fluidos e eletrólitos no trato digestório são importantes, mas também podem não ser a única forma de explicar como esta relação se dá, já que circuitos neurais também estão envolvidos. O hipotálamo lateral, que possui diferentes populações neuronais relacionadas com ingestão de alimentos pode servir de catalizador da integração entre fome e sede (VAN DIJK *et al.*, 2011), já que há projeções de núcleos desta região, como o núcleo arqueado, tanto para o PVN (SAPRU, 2013) como para o SFO (ROSAS-ARELLANO; SOLANO-FLORES; CIRIELLO, 1993). Ainda, estas três regiões podem se projetar para regiões bulbares atuando no controle do sistema nervoso autônomo simpático, fechando um ciclo de controle cardiovascular, metabólico e hidroeletrolítico (FERGUSON; DAY; RENAUD, 1984; SAPRU, 2013). A relação destas vias pode servir às informações periféricas que chegam ao SFO, incluindo a ANG II, no controle integrado entre os balanços metabólicos e hidroeletrolíticos. Isto posto, as observações desta tese indicam que o SRA pode estar relacionado com a ingestão de água associada à ingestão de alimentos, como uma forma de compensar o aporte de substrato via TGI à circulação sanguínea. Este efeito pode servir de proteção contra possíveis alterações no volume circulante no período imediatamente após a alimentação.

7. CONCLUSÃO

Nossos dados trazem nova luz sobre os mecanismos pelos quais a ANG II participa na regulação homeostática e comportamental integrada frente a desafios metabólicos, permitindo as seguintes conclusões:

- Neurônios do SFO responsivos à ANG II também podem perceber alterações na concentração de glicose, mesmo que não haja uma distribuição destes neurônios em algum dos fenótipos de glicossensibilidade.
- A incubação em diferentes concentrações de glicose não altera a expressão de AT_{1a} em células isoladas do SFO.
- A resposta de um neurônio do SFO a ANG II pode variar de acordo com a concentração de glicose agudamente, sendo que quanto maior a concentração da glicose, maior a proporção de neurônios que respondem.
- A privação alimentar de 24h e 48h leva a ativação do SRA periférico, com aumento das concentrações plasmáticas de ANG I e II, mas somente às 48h leva ao aumento da expressão de mRNA de AT_{1a} no SFO.
- Apesar de *in vitro* a glicose não alterar a expressão de receptores AT₁, o jejum de 48h ativa o SRA e isso leva ao aumento da expressão de AT₁ no SFO.
- O bloqueio AT₁ sistêmico em baixas doses atenua a diminuição da glicemia após 48h de jejum.
- Em condições basais, o bloqueio central de receptores AT₁ tem um efeito subcrônico na diminuição da ingestão de água e de alimentos.
- O aumento da ANG II plasmática está envolvido com a ingestão de água associada à alimentação, provavelmente como um mecanismo de defesa do organismo a desidratação durante a ingestão de comida.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIM, I. et al. Actions of adiponectin on the excitability of subfornical organ neurons are altered by food deprivation. **Brain Research**, v. 1330, p. 72–82, 2010.
- ALPONTI, R. F.; SILVEIRA, P. F. Neutral Aminopeptidase and Dipeptidyl Peptidase IV Activities in Plasma of Monosodium Glutamate Obese and Food-deprived Rats. **Obesity**, v. 18, n. 7, p. 1312–1317, 2009.
- ANSAR, S. et al. MAPK signaling pathway regulates cerebrovascular receptor expression in human cerebral arteries. **BMC Neuroscience**, v. 14, n. 1, p. 12, 23 dez. 2013.
- ANTUNES-RODRIGUES, J. Neuroendocrine Control of Body Fluid Metabolism. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 1, p. 169–208, 2004.
- ATKINSON, A. B. et al. Angiotensin II and renal hypertension in dog, rat and man: effect of converting enzyme inhibition. **Clinical and experimental hypertension**, v. 2, n. 3–4, p. 499–524, 1980.
- BALI, A.; JAGGI, A. S. Angiotensin as stress mediator: Role of its receptor and interrelationships among other stress mediators and receptors. **Pharmacological Research**, v. 76, p. 49–57, out. 2013.
- BANKS, W. A.; OWEN, J. B.; ERICKSON, M. A. Insulin in the brain: There and back again. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 136, n. 1, p. 82–93, out. 2012.
- BARTH, E. et al. Glucose metabolism and catecholamines. **Critical Care Medicine**, v. 35, n. Suppl, p. S508–S518, set. 2007.
- BARTH, S. W.; GERSTBERGER, R. Differential regulation of angiotensinogen and AT1A receptor mRNA within the rat subfornical organ during dehydration. **Molecular Brain Research**, v. 64, n. 2, p. 151–164, 5 fev. 1999.
- BASSO, N.; TERRAGNO, N. A. History About the Discovery of the Renin-Angiotensin System. **Hypertension**, v. 38, n. 6, p. 1246–1249, 25 dez. 2001.
- BATALLER, R. et al. Liver Fibrogenesis: A New Role for the Renin-Angiotensin System. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 7, n. 9–10, p. 1346–1355, set. 2005.
- BAUTISTA, R. et al. Angiotensin II-dependent increased expression of Na⁺-glucose cotransporter in hypertension. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 286, n. 1, p. F127–F133, jan. 2004.
- BERESFORD, M.; FITZSIMONS, J. Intracerebroventricular angiotensin II-induced thirst and sodium appetite in rat are blocked by the AT1 receptor antagonist, Losartan (DuP 753), but not by the AT2 antagonist, CGP 42112B. **Experimental Physiology**, v. 77, n. 5, p. 761–764, 1 set. 1992.
- BONVENTRE, J. V. Phospholipase A2 and signal transduction. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 3, n. 2, p. 128–50, ago. 1992.
- BORGHI, C.; ROSSI, F. Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Its Pharmacological Inhibitors in Cardiovascular Diseases: Complex and Critical Issues. **High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention**, v. 22, n. 4, p. 429–444, 24 dez. 2015.

- BOTELHO, L. M. O. et al. Plasma angiotensin(1–7) immunoreactivity is increased by salt load, water deprivation, and hemorrhage. **Peptides**, v. 15, n. 4, p. 723–729, jan. 1994.
- BOUSTANY, C. M. et al. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 287, n. 4, p. R943–R949, out. 2004.
- BRAUN-MENENDEZ, E.; PAGE, I. H. Suggested Revision of Nomenclature--Angiotensin. **Science**, v. 127, n. 3292, p. 242–242, 31 jan. 1958.
- BRINK, M. et al. Angiotensin II Induces Skeletal Muscle Wasting through Enhanced Protein Degradation and Down-Regulates Autocrine Insulin-Like Growth Factor I 1. **Endocrinology**, v. 142, n. 4, p. 1489–1496, abr. 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. **Journal of Clinical Investigation**, v. 97, n. 11, p. 2509–2516, 1 jun. 1996.
- BRIONES, A. M. et al. Adipocytes Produce Aldosterone Through Calcineurin-Dependent Signaling Pathways. **Hypertension**, v. 59, n. 5, p. 1069–1078, maio 2012.
- BURDAKOV, D.; LUCKMAN, S. M.; VERKHRATSKY, A. Glucose-sensing neurons of the hypothalamus. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 360, n. 1464, p. 2227–35, 2005.
- CABANDUGAMA, P. K.; GARDNER, M. J.; SOWERS, J. R. The Renin Angiotensin Aldosterone System in Obesity and Hypertension. **Medical Clinics of North America**, v. 101, n. 1, p. 129–137, jan. 2017.
- CANCELLIERE, N. M.; FERGUSON, A. V. Subfornical organ neurons integrate cardiovascular and metabolic signals. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 312, n. 2, p. R253–R262, 1 fev. 2017.
- CARPENTER, C. C. J.; DAVIS, J. O.; AYERS, C. R. Relation of Renin, Angiotensin II, and Experimental Renal Hypertension to Aldosterone Secretion. **Journal of Clinical Investigation**, v. 40, n. 11, p. 2026–2042, 1 nov. 1961.
- CARRETERO, O. A. et al. Role of the renin-angiotensin system in the pathogenesis of severe hypertension in rats. **Circulation research**, v. 29, n. 6, p. 654–63, dez. 1971.
- CASSIS, L. et al. Angiotensin II regulates oxygen consumption. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 282, n. 2, p. R445–R453, fev. 2002.
- CASSIS, L. A. et al. Local adipose tissue renin-angiotensin system. **Current Hypertension Reports**, v. 10, n. 2, p. 93–98, 27 abr. 2008.
- CASSIS, L. A. et al. Mechanisms contributing to angiotensin II regulation of body weight. **The American journal of physiology**, v. 274, n. 5 Pt 1, p. E867-76, maio 1998.
- CASTRO, M.; FIGUEIREDO, F.; MOREIRA, A. Time-Course of Hypothalamic CRH and Pituitary ACTH Contents, and Pituitary Responsiveness to CRH Stimulation After Bilateral Adrenalectomy. **Hormone and Metabolic Research**, v. 27, n. 01, p. 10–15, 23 jan. 1995.
- CHAMPMAN, B. J.; BOOKS, D. P.; MUNDAY, K. A. Half-Life of Angiotensin II in the

Conscious and Barbiturate-Anaesthetizes Rat. **British Journal of Anaesthesia**, v. 52, n. 4, p. 389–393, abr. 1980.

COBLE, J. P. et al. Mechanisms of brain renin angiotensin system-induced drinking and blood pressure: importance of the subfornical organ. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 308, n. 4, p. R238–R249, 15 fev. 2015.

CODY, R. J. The Sympathetic Nervous System and the Renin–Angiotensin–Aldosterone System in Cardiovascular Disease. **The American Journal of Cardiology**, v. 80, n. 9, p. 9J–14J, nov. 1997.

COSTA-NETO, C. M. et al. Non-canonical signalling and roles of the vasoactive peptides angiotensins and kinins. **Clinical Science**, v. 126, n. 11, p. 753–774, 1 jun. 2014.

DANEMAN, R.; PRAT, A. The Blood–Brain Barrier. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 1, p. a020412, 5 jan. 2015.

DE KLOET, A. D. et al. The Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition Using Captopril on Energy Balance and Glucose Homeostasis. **Endocrinology**, v. 150, n. 9, p. 4114–4123, set. 2009.

DE KLOET, A. D. et al. Reporter mouse strain provides a novel look at angiotensin type-2 receptor distribution in the central nervous system. **Brain Structure and Function**, v. 221, n. 2, p. 891–912, 27 mar. 2016.

DELLMANN, H. D.; SIMPSON, J. B. The Subfornical Organ. In: **International Review of Cytology**. [s.l.: s.n.]. p. 333–421.

DEMARCO, V. G.; AROOR, A. R.; SOWERS, J. R. The pathophysiology of hypertension in patients with obesity. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, n. 6, p. 364–376, 15 abr. 2014.

DIEZ-SAMPEDRO, A. et al. A glucose sensor hiding in a family of transporters. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 20, p. 11753–8, 2003.

DIZ, D. I.; BAER, P. G.; NASJLETTI, A. Angiotensin II-induced hypertension in the rat. Effects on the plasma concentration, renal excretion, and tissue release of prostaglandins. **Journal of Clinical Investigation**, v. 72, n. 2, p. 466–477, 1 ago. 1983.

DOS-SANTOS, R. C. et al. Central angiotensin-(1–7) increases osmotic thirst. **Experimental Physiology**, v. 102, n. 11, 2017a.

DOUGLAS, J. G. Angiotensin receptor subtypes of the kidney cortex. **The American journal of physiology**, v. 253, n. 1 Pt 2, p. F1–7, jul. 1987.

ENGELI, S. et al. Co-expression of renin-angiotensin system genes in human adipose tissue. **J Hypertens**, v. 17, n. 4, p. 555–560, 1999.

EPSTEIN, A. N.; FITZSIMONS, J. T.; ROLLS, B. J. Drinking induced by injection of angiotensin into the brain of the rat. **The Journal of Physiology**, v. 210, n. 2, p. 457–474, 1 set. 1970.

FENG, Y.-H. et al. Unconventional Homologous Internalization of the Angiotensin II Type-1 Receptor Induced by G-Protein–Independent Signals. **Hypertension**, v. 46, n. 2, p. 419–425, ago. 2005.

FERGUSON, A. V. Circumventricular Organs: Integrators of Circulating Signals Controlling Hydration, Energy Balance, and Immune Function. In: DE LUCA, L.A. JR; MENANI, J.V.; JOHNSON, A. K. (Ed.). . **Neurobiology of Body Fluid Homeostasis: Transduction and Integration**. 1. ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2014.

FERGUSON, A. V.; KASTING, N. W. Electrical stimulation in subfornical organ increases plasma vasopressin concentrations in the conscious rat. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 251, n. 2, p. R425–R428, ago. 1986.

FERGUSON, S. S. G. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. **Pharmacological reviews**, v. 53, n. 1, p. 1–24, mar. 2001.

FERGUSON, A. V. Paraventricular nucleus neurons projecting to the dorsomedial medulla are influenced by systemic angiotensin. **Brain Research Bulletin**, v. 20, n. 2, p. 197–201, fev. 1988.

FERGUSON, A. V.; BAINS, J. S. Actions of Angiotensin II in the Subfornical Organ and Area Postrema: Long Term Control of Autonomic Output. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 24, n. 1, p. 96–101, jan. 1997.

FERGUSON, A. V.; KASTING, N. W. Activation of subfornical organ efferents stimulates oxytocin secretion in the rat. **Regulatory Peptides**, v. 18, n. 2, p. 93–100, ago. 1987.

FERGUSON, A. V.; KASTING, N. W. Angiotensin acts at the subfornical organ to increase plasma oxytocin concentrations in the rat. **Regulatory peptides**, v. 23, n. 3, p. 343–52, dez. 1988.

FERGUSON, A V; DAY, T. A; RENAUD, L. P. Subfornical organ stimulation excites paraventricular neurons projecting to dorsal medulla. **The American journal of physiology**, v. 247, n. 6 Pt 2, p. R1088-92, dez. 1984.

FERGUSON, A V; RENAUD, L. P. Systemic angiotensin acts at subfornical organ to facilitate activity of neurohypophysial neurons. **The American journal of physiology**, v. 251, n. 4 Pt 2, p. R712-7, out. 1986.

FERGUSON, A. V et al. Dissociated adult rat subfornical organ neurons maintain membrane properties and angiotensin responsiveness for up to 6 days. **Neuroendocrinology**, v. 66, n. 6, p. 409–15, dez. 1997.

FINK, G. D.; BRUNER, C. A.; MANGIAPANE, M. L. Area postrema is critical for angiotensin-induced hypertension in rats. **Hypertension**, v. 9, n. 4, p. 355–361, abr. 1987.

FITZSIMONS, J. T. The Eighth J. A. F. Stevenson Memorial Lecture Angiotensin II in the control of hypovolaemic thirst and sodium appetite. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 58, n. 5, p. 441–444, maio 1980.

FYHRQUIST, F. et al. Angiotensin II plasma levels in hypertensive patients. **Acta medica Scandinavica**, v. 192, n. 6, p. 507–11, dez. 1972.

GIACCHETTI, G. et al. Angiotensin II and the adrenal. **Clinical and experimental pharmacology & physiology. Supplement**, v. 3, n. S3, p. S119-24, set. 1996.

GRAUS-NUNES, F. et al. Differential effects of angiotensin receptor blockers on pancreatic islet remodelling and glucose homeostasis in diet-induced obese mice. **Molecular and**

Cellular Endocrinology, v. 439, p. 54–64, jan. 2017.

GRAUS-NUNES, F.; SOUZA-MELLO, V. The renin-angiotensin system as a target to solve the riddle of endocrine pancreas homeostasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, n. October 2018, p. 639–645, jan. 2019.

GREENWOOD, M. P. et al. A comparison of physiological and transcriptome responses to water deprivation and salt loading in the rat supraoptic nucleus. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 308, n. 7, p. R559–R568, 2015.

GRONAN, R. J.; YORK, D. H. Effects of chronic intraventricular administration of angiotensin II on drinking behavior and blood pressure. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 10, n. 1, p. 121–126, jan. 1979.

HALL, J. E. et al. Obesity-Induced Hypertension: Interaction of Neurohumoral and Renal Mechanisms. **Circulation Research**, v. 116, n. 6, p. 991–1006, 2015.

HARRISON-BERNARD, L. M. et al. Intrarenal AT 1 receptor and ACE binding in ANG II-induced hypertensive rats. v. 2699, p. 19–25, 2018.

HATTING, M. et al. Insulin regulation of gluconeogenesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1411, n. 1, p. 21–35, jan. 2018.

HAYABUCHI, Y.; DAVIES, N. W.; STANDEN, N. B. Angiotensin II inhibits rat arterial KATP channels by inhibiting steady-state protein kinase A activity and activating protein kinase Ce. **The Journal of physiology**, v. 530, n. Pt 2, p. 193–205, 15 jan. 2001.

HAYNES, W. G. et al. Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 2, p. 270–278, 15 jul. 1997.

HE, H. et al. Telmisartan Prevents Weight Gain and Obesity Through Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- δ -Dependent Pathways. **Hypertension**, v. 55, n. 4, p. 869–879, abr. 2010.

HINDMARCH, C. et al. Microarray analysis of the transcriptome of the subfornical organ in the rat: regulation by fluid and food deprivation. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 295, n. 6, p. R1914–R1920, dez. 2008.

HOCHWALD, G. M.; MAGEE, J.; FERGUSON, V. Cerebrospinal Fluid Glucose: Turnover and Metabolism. **Journal of Neurochemistry**, v. 44, n. 6, p. 1832–1837, 1985.

HOFER, H. Zur Morphologie der circumventrikulären Organe des Zwischenhirns der Säugetiere. **Verhandl. Deut. Zool. Ges.**, v. 8, p. 202–251, 1958.

IAN PHILLIPS, M.; SPEAKMAN, E. A.; KIMURA, B. Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. **Regulatory Peptides**, v. 43, n. 1–2, p. 1–20, jan. 1993.

ITO, S.; SVED, A. F. Blockade of angiotensin receptors in rat rostral ventrolateral medulla removes excitatory vasomotor tone. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 270, n. 6, p. R1317–R1323, jun. 1996.

JOHREN, O.; INAGAMI, T.; SAAVEDRA, J. M. AT1A, AT1B, and AT2 angiotensin II receptor subtype gene expression in rat brain. **Neuroreport**, v. 6, n. 18, p. 2549–52, 15 dez.

1995.

KANNEL, W. B. et al. The relation of adiposity to blood pressure and development of hypertension. The Framingham study. **Annals of internal medicine**, v. 67, n. 1, p. 48–59, jul. 1967.

KIKUMOTO, Y. et al. Sensitization to alloxan-induced diabetes and pancreatic cell apoptosis in acatalasemic mice. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1802, n. 2, p. 240–246, fev. 2010.

KINTSCHER, U. et al. Irbesartan for the treatment of hypertension in patients with the metabolic syndrome: A sub analysis of the Treat to Target post authorization survey. Prospective observational, two armed study in 14,200 patients. **Cardiovascular Diabetology**, v. 6, n. 1, p. 12, 2007.

KISS, A.; JEZOVA, D.; AGUILERA, G. Activity of the hypothalamic pituitary adrenal axis and sympathoadrenal system during food and water deprivation in the rat. **Brain Research**, v. 663, n. 1, p. 84–92, nov. 1994.

KRALY, F. S. Physiology of drinking elicited by eating. **Psychological Review**, v. 91, n. 4, p. 478–490, 1984.

KRALY, F. S. et al. Angiotensin AT1 and AT2 receptors contribute to drinking elicited by eating in rats. **Physiology & behavior**, v. 58, n. 6, p. 1099–109, dez. 1995.

KRALY, F. S.; CORNEILSON, R. Angiotensin II mediates drinking elicited by eating in the rat. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 258, n. 2, p. R436–R442, fev. 1990.

KRAUSE, E. G. et al. Blood-Borne Angiotensin II Acts in the Brain to Influence Behavioral and Endocrine Responses to Psychogenic Stress. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 42, p. 15009–15015, 19 out. 2011.

KUBO, M.; QUAYLE, J. M.; STANDEN, N. B. Angiotensin II inhibition of ATP-sensitive K⁺ currents in rat arterial smooth muscle cells through protein kinase C. **The Journal of physiology**, v. 503 (Pt 3, p. 489–96, 15 set. 1997.

KUO, T. et al. Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids. **Adv Exp Med Biol**, v. 872, p. 99–126, 2015.

LANDSBERG, L. Insulin-mediated sympathetic stimulation: role in the pathogenesis of obesity-related hypertension (or, how insulin affects blood pressure, and why). **Journal of Hypertension**, v. 19, n. Supplement, p. 523–528, mar. 2001.

LAVOIE, J. L.; SIGMUND, C. D. Minireview: Overview of the Renin-Angiotensin System—An Endocrine and Paracrine System. **Endocrinology**, v. 144, n. 6, p. 2179–2183, jun. 2003.

LENKEI, Z. et al. Expression of Angiotensin Type-1 (AT1) and Type-2 (AT2) Receptor mRNAs in the Adult Rat Brain: A Functional Neuroanatomical Review. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 18, n. 4, p. 383–439, out. 1997.

LEPKOVSKY, S. et al. Gastrointestinal Regulation of Water and Its Effect on Food Intake and Rate of Digestion. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 188, n. 2, p. 327–331, 31 jan. 1957.

- LEUNG, P. S. The physiology of a local renin-angiotensin system in the pancreas. **The Journal of Physiology**, v. 580, n. 1, p. 31–37, 1 abr. 2007.
- LEUNG, P. S.; CHAPPELL, M. C. A local pancreatic renin-angiotensin system: endocrine and exocrine roles. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, n. 6, p. 838–846, jun. 2003.
- LI, X.-M. et al. The role of leptin in central nervous system diseases. **NeuroReport**, v. 27, n. 5, p. 1, fev. 2016.
- LI, X. C.; CARRETERO, O. A.; ZHUO, J. L. Cross-talk between angiotensin II and glucagon receptor signaling mediates phosphorylation of mitogen-activated protein kinases ERK 1/2 in rat glomerular mesangial cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 12, p. 1711–1719, jun. 2006.
- LI, Z.; FERGUSON, A. V. Angiotensin II responsiveness of rat paraventricular and subfornical organ neurons in vitro. **Neuroscience**, v. 55, n. 1, p. 197–207, jul. 1993a.
- LI, Z.; FERGUSON, A. V. Subfornical organ efferents to paraventricular nucleus utilize angiotensin as a neurotransmitter. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 265, n. 2, p. R302–R309, ago. 1993b.
- LIND, R. W.; VAN HOESEN, G. W.; JOHNSON, A. K. An HRP study of the connections of the subfornical organ of the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 210, n. 3, p. 265–277, 20 set. 1982.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.
- LUPI, R. et al. The direct effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitors, zofenoprilat and enalaprilat, on isolated human pancreatic islets. **European Journal of Endocrinology**, v. 154, n. 2, p. 355–361, fev. 2006.
- MACHADO, H. et al. Dissociation of antihypertensive and metabolic response to losartan and spironolactone in experimental rats with metabolic syndrome. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 34, n. 4, p. 328–336, 2012.
- MANRIQUE, C. et al. The Renin Angiotensin Aldosterone System in Hypertension: Roles of Insulin Resistance and Oxidative Stress. **Medical Clinics of North America**, v. 93, n. 3, p. 569–582, maio 2009.
- MATSUSAKA, T.; ICHIKAWA, I. Biological Functions of Angiotensin and its Receptors. **Annual Review of Physiology**, v. 59, n. 1, p. 395–412, 30 out. 1997.
- MCFARLAND, D. J.; ROLLS, B. Suppression of Feeding by Intracranial Injections of Angiotensin. **Nature**, v. 236, n. 5343, p. 172–173, mar. 1972.
- MCKINLEY, M. J. et al. Physiological actions of angiotensin II mediated by AT1 and AT2 receptors in the brain. **Clinical and experimental pharmacology & physiology. Supplement**, v. 3, p. S99-104, 1996.
- MECAWI, A. DE S. et al. Neuroendocrine Regulation of Hydromineral Homeostasis. **Comprehensive Physiology**, v. 5, n. 3, p. 1465–516, 1 jul. 2015.
- MECAWI, A. S. et al. The Role of Angiotensin II on Sodium Appetite After a Low-Sodium

- Diet. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 25, n. 3, p. 281–291, mar. 2013.
- MEDEIROS, N.; DAI, L.; FERGUSON, A. V. Glucose-responsive neurons in the subfornical organ of the rat—a novel site for direct CNS monitoring of circulating glucose. **Neuroscience**, v. 201, p. 157–165, 2012.
- MIALHE, B. K. C.; BRIAUD, B. Involvement of Vasopressin in Corticotropin-Releasing Effect of Hypothalamic Median Eminence Extract. v. 182, p. 178–182, 1980.
- MIESEL, A. et al. Double blockade of angiotensin II (AT1)-receptors and ACE does not improve weight gain and glucose homeostasis better than single-drug treatments in obese rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 8, p. 2721–2735, abr. 2012.
- MILDNER, M. et al. Glucagon increase after chronic AT1 blockade is more likely related to an indirect leptin-dependent than to a pancreatic α -cell-dependent mechanism. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 390, n. 5, p. 505–518, 31 maio 2017.
- MIMEE, A.; SMITH, P. M.; FERGUSON, A. V. Circumventricular organs: Targets for integration of circulating fluid and energy balance signals? **Physiology & Behavior**, v. 121, p. 96–102, set. 2013.
- MIYATA, S. New aspects in fenestrated capillary and tissue dynamics in the sensory circumventricular organs of adult brains. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, n. OCT, p. 1–15, 27 out. 2015.
- MOELLENHOFF, E. et al. Effect of repetitive icv injections of ANG II on c-Fos and AT 1 -receptor expression in the rat brain. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 280, n. 4, p. R1095–R1104, abr. 2001.
- MÜLLER-FIELITZ, H. et al. Improved Insulin Sensitivity after Long-Term Treatment with AT 1 Blockers Is Not Associated with PPAR γ Target Gene Regulation. **Endocrinology**, v. 153, n. 3, p. 1103–1115, mar. 2012.
- MÜLLER-FIELITZ, H. et al. Chronic blockade of angiotensin AT 1 receptors improves cardinal symptoms of metabolic syndrome in diet-induced obesity in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 3, p. 746–760, fev. 2014.
- MÜLLER-FIELITZ, H. et al. Preventing leptin resistance by blocking angiotensin II AT 1 receptors in diet-induced obese rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 3, p. 857–868, fev. 2015.
- MÜLLER, T. D. et al. The New Biology and Pharmacology of Glucagon. **Physiological Reviews**, v. 97, n. 2, p. 721–766, abr. 2017.
- MULLICK, A. E. et al. Blood Pressure Lowering and Safety Improvements With Liver Angiotensinogen Inhibition in Models of Hypertension and Kidney Injury. **Hypertension**, v. 70, n. 3, p. 566–576, set. 2017.
- MUTHALIF, M. M. et al. Angiotensin II-induced hypertension: contribution of Ras GTPase/Mitogen-activated protein kinase and cytochrome P450 metabolites. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 36, n. 4, p. 604–9, out. 2000.
- NAKAMURA, K. et al. Angiotensin II acting on brain AT1 receptors induces adrenaline secretion and pressor responses in the rat. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 7248, 28 maio 2015.

- NAKANO-TATENO, T. 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, jan. 2012.
- O'MALLEY, D. et al. Sodium-coupled glucose cotransporters contribute to hypothalamic glucose sensing. **Diabetes**, v. 55, n. 12, p. 3381–3386, 2006.
- OHINATA, K. et al. Angiotensin II and III suppress food intake via angiotensin AT 2 receptor and prostaglandin EP 4 receptor in mice. **FEBS Letters**, v. 582, n. 5, p. 773–777, 5 mar. 2008.
- ONO, K.; HONDA, E.; INENAGA, K. Angiotensin II induces inward currents in subfornical organ neurones of rats. **Journal of neuroendocrinology**, v. 13, n. 6, p. 517–23, jun. 2001.
- ÖSTLUND, G.; SONNHAMMER, E. L. L. Quality criteria for finding genes with high mRNA-protein expression correlation and coexpression correlation. **Gene**, v. 497, n. 2, p. 228–236, 2012.
- PALS, D. T. et al. Role of the pressor action of angiotensin II in experimental hypertension. **Circulation research**, v. 29, n. 6, p. 673–81, dez. 1971.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 6th Ed ed. San Diego: [s.n.].
- PERELLO, M.; STUART, R. C.; NILLNI, E. A. Differential effects of fasting and leptin on proopiomelanocortin peptides in the arcuate nucleus and in the nucleus of the solitary tract. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 292, n. 5, p. E1348–E1357, maio 2007.
- PETERSEN, M. C.; VATNER, D. F.; SHULMAN, G. I. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 10, p. 572–587, 21 out. 2017.
- PORCARI, C. Y. et al. Whole body sodium depletion modifies AT1 mRNA expression and serotonin content in the dorsal raphe nucleus. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 31, n. 4, p. e12703, abr. 2019.
- PORTER, J. P. Chronic intracerebroventricular infusion of angiotensin II increases brain AT1 receptor expression in young rats. **Developmental Brain Research**, v. 112, n. 2, p. 293–295, fev. 1999.
- PORTER, J. P.; POTRATZ, K. 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. R422-8, ago. 2004.
- PREMARATNA, S. D. et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition reverses diet-induced obesity, insulin resistance and inflammation in C57BL/6J mice. **International Journal of Obesity**, v. 36, n. 2, p. 233–243, 10 fev. 2012.
- PULMAN, K. J. The Subfornical Organ: A Central Target for Circulating Feeding Signals. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 7, p. 2022–2030, 15 fev. 2006.
- RAUCH, M. et al. Electrophysiological and Immunocytochemical Evidence for a cGMP-Mediated Inhibition of Subfornical Organ Neurons by Nitric Oxide. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 363–371, 1 jan. 1997.

REGOLI, M. et al. Angiotensinogen localization and secretion in the rat pancreas. **Journal of Endocrinology**, v. 179, n. 1, p. 81–89, 1 out. 2003.

REID, J. L. Review: Molecular-specific effects of angiotensin II antagonists: clinical relevance to treating hypertension? **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 6, n. 1, p. 15–24, 22 mar. 2005.

RIEDIGER, T.; RAUCH, M.; SCHMID, H. A. Actions of amylin on subfornical organ neurons and on drinking behavior in rats. **AJP: Regulatory, Integrative, & Comparative Physiology**, v. 276, n. 2 Pt 2, p. R514-21, 1999.

ROBERTSON, G. L. et al. Development and Clinical Application of a New Method for the Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Plasma. **Journal of Clinical Investigation**, v. 52, n. 9, p. 2340–2352, 1 set. 1973.

ROLLS, R. J.; MCFARLAND, D. J. Hydration releases inhibition of feeding produced by intracranial angiotensin. **Physiology & behavior**, v. 11, n. 6, p. 881–4, dez. 1973.

ROSAS-ARELLANO, M. P.; SOLANO-FLORES, L. P.; CIRIELLO, J. Effect of arcuate nucleus activation on neuronal activity in subfornical organ. **Brain Research**, v. 619, n. 1–2, p. 352–356, ago. 1993.

ROWLAND, N. E.; FREGLY, M. J. Brain angiotensin AT-2 receptor antagonism and water intake. **Brain research bulletin**, v. 32, n. 4, p. 391–4, 1993.

RUBIN, B.; ANTONACCIO, M. J.; HOROVITZ, Z. P. Captopril (SQ 14,225) (d-3-mercapto-2-methylpropanoyl-l-proline): A novel orally active inhibitor of angiotensin-converting enzyme and antihypertensive agent. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 21, n. 3, p. 183–194, nov. 1978.

SAGAE, S. C. et al. Prevention of metabolic disorders and reproductive performance deficits by the blockade of Angiotensin II AT1 receptor in female rats fed with cafeteria diet. **Physiology & Behavior**, v. 119, p. 1–8, jul. 2013.

SAHR, A. et al. The Angiotensin-(1–7)/Mas Axis Improves Pancreatic β -Cell Function in Vitro and in Vivo. **Endocrinology**, v. 157, n. 12, p. 4677–4690, 1 dez. 2016.

SANTOS, E. L. et al. Effect of angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on body weight and composition in young rats. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 2, p. 247–253, fev. 2008.

SAPRU, H. N. Role of the hypothalamic arcuate nucleus in cardiovascular regulation. **Autonomic Neuroscience**, v. 175, n. 1–2, p. 38–50, abr. 2013.

SCHEEPERS, A.; JOOST, H.-G.; SCHÜRMAN, A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. **JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition**, v. 28, n. 5, p. 364–371, 2015.

SCHMID, H. A.; SIMON, E. Effect of angiotensin II and atrial natriuretic factor on neurons in the subfornical organ of ducks and rats in vitro. **Brain Research**, v. 588, n. 2, p. 324–328, ago. 1992.

SCHUSTER, F. et al. Telmisartan prevents diet-induced obesity and preserves leptin transport across the blood-brain barrier in high-fat diet-fed mice. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 470, n. 11, p. 1673–1689, 5 nov. 2018.

- SCHÜTTEN, M. T. J. et al. The Link Between Adipose Tissue Renin-Angiotensin-Aldosterone System Signaling and Obesity-Associated Hypertension. **Physiology**, v. 32, n. 3, p. 197–209, maio 2017.
- SCHWEDA, F. Salt feedback on the renin-angiotensin-aldosterone system. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 467, n. 3, p. 565–576, 13 mar. 2015.
- SHARIEH HOSSEINI, S. G.; KHATAMSAZ, S.; SHARIATI, M. The effects of losartan on memory performance and leptin resistance induced by obesity and high-fat diet in adult male rats. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 17, n. 1, p. 41–8, jan. 2014.
- SICA, D. A.; GEHR, T. W. B.; GHOSH, S. Clinical Pharmacokinetics of Losartan. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 44, n. 8, p. 797–814, 2005.
- SIMPSON, J. B.; EPSTEIN, A. N.; CAMARDO, J. S. Localization of receptors for the dipsogenic action of angiotensin II in the subfornical organ of rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 92, n. 4, p. 581–608, 1978.
- SIMPSON, J. B.; ROUTTENBERG, A. Subfornical organ: site of drinking elicitation by angiotensin II. **Science (New York, N.Y.)**, v. 181, n. 4105, p. 1172–5, 21 set. 1973.
- SIMPSON, N. J.; FERGUSON, A. V. Tumor necrosis factor- α potentiates the effects of angiotensin II on subfornical organ neurons. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 315, n. 3, p. R425–R433, set. 2018.
- SIMPSON, N. J.; FERGUSON, A. V. The pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha excites subfornical organ neurons. **Journal of neurophysiology**, p. jn.00238.2017, 21 jun. 2017.
- SMITH, P. M. et al. The subfornical organ: a central nervous system site for actions of circulating leptin. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 296, n. 3, p. R512–R520, mar. 2009.
- SMITH, P. M. et al. AT1 receptor blockade alters nutritional and biometric development in obesity-resistant and obesity-prone rats submitted to a high fat diet. **Frontiers in psychology**, v. 5, n. July, p. 832, 2014.
- SMITH, P. M.; BENINGER, R. J.; FERGUSON, A. V. Subfornical organ stimulation elicits drinking. **Brain research bulletin**, v. 38, n. 3, p. 209–13, 1995.
- SMITH, P. M.; ROZANSKI, G.; FERGUSON, A. V. Physiology & Behavior Acute electrical stimulation of the subfornical organ induces feeding in satiated rats. **Physiology & Behavior**, v. 99, n. 4, p. 534–537, 2010.
- SMULYAN, H.; VILLARREAL, D. The Birth of Angiotensin: An International Compromise. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 357, n. 3, p. 179–183, mar. 2019.
- SPARKS, M. A. et al. Classical Renin-Angiotensin System in Kidney Physiology. In: **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2014. v. 4p. 1201–1228.
- SUMITOMO, T. et al. Angiotensin II Increases the Corticotropin-Releasing Factor Messenger Ribonucleic Acid Level in the Rat Hypothalamus*. **Endocrinology**, v. 128, n. 5, p. 2248–2252, maio 1991.

TABÁK, A. G. et al. Trajectories of glycaemia, insulin sensitivity, and insulin secretion before diagnosis of type 2 diabetes: an analysis from the Whitehall II study. **Lancet (London, England)**, v. 373, n. 9682, p. 2215–21, 2009.

TAKAYAMA, K. et al. Expression of c-Fos protein in the brain after intravenous injection of ghrelin in rats. **Neuroscience Letters**, v. 417, n. 3, p. 292–296, maio 2007.

TAKIMOTO-OHNISHI, E.; MURAKAMI, K. Renin–angiotensin system research: from molecules to the whole body. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 69, n. 4, p. 581–587, 26 jul. 2019.

TAN, W. S. D. et al. Targeting the renin–angiotensin system as novel therapeutic strategy for pulmonary diseases. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 40, p. 9–17, jun. 2018.

THRASHER, T. N.; SIMPSON, J. B.; RAMSAY, D. J. Lesions of the Subfornical Organ Block Angiotensin-Induced Drinking in the Dog. **Neuroendocrinology**, v. 35, n. 1, p. 68–72, 1982.

TIKELLIS, C. et al. Improved Islet Morphology after Blockade of the Renin- Angiotensin System in the ZDF Rat. **Diabetes**, v. 53, n. 4, p. 989–997, 1 abr. 2004.

TOBLLI, J. E. et al. ACE Inhibition and AT1 Receptor Blockade Prevent Fatty Liver and Fibrosis in Obese Zucker Rats. **Obesity**, v. 16, n. 4, p. 770–776, 24 abr. 2008.

TONEY, G. M.; PORTER, J. P. Effects of blockade of AT1 and AT2 receptors in brain on the central angiotensin II pressor response in conscious spontaneously hypertensive rats. **Neuropharmacology**, v. 32, n. 6, p. 581–9, jun. 1993.

TOUYZ, R. M.; BERRY, C. Recent advances in angiotensin II signaling. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 9, p. 1001–1015, set. 2002.

USHIO-FUKAI, M. et al. Temporal Dispersion of Activation of Phospholipase C- β 1 and - γ Isoforms by Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 31, p. 19772–19777, 31 jul. 1998.

VAN DEN TOP, M. et al. The impact of ageing, fasting and high-fat diet on central and peripheral glucose tolerance and glucose-sensing neural networks in the arcuate nucleus. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 29, n. 10, p. e12528, out. 2017.

VAN DIJK, G. et al. The lateral hypothalamus: A site for integration of nutrient and fluid balance. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n. 2, p. 481–487, ago. 2011.

VIEIRA, E.; LIU, Y.; GYLFE, E. Involvement of alpha1 and beta-adrenoceptors in adrenaline stimulation of the glucagon-secreting mouse alpha-cell. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 369, n. 2, p. 179–183, 1 fev. 2004.

WANG, R. et al. The regulation of glucose-excited neurons in the hypothalamic arcuate nucleus by glucose and feeding-relevant peptides. **Diabetes**, v. 53, n. 8, p. 1959–1965, 2004.

WEBER, M. A. Comparison of type 1 angiotensin II receptor blockers and angiotensin converting enzyme inhibitors in the treatment of hypertension. **Journal of hypertension. Supplement : official journal of the International Society of Hypertension**, v. 15, n. 6, p. S31–6, dez. 1997.

WEISINGER, H. S. et al. Angiotensin converting enzyme inhibition from birth reduces body weight and body fat in Sprague-Dawley rats. **Physiology and Behavior**, v. 93, n. 4–5, p. 820–

825, 2008.

WEISINGER, R. S. et al. Role of brain angiotensin in thirst and sodium appetite of rats. **Peptides**, v. 18, n. 7, p. 977–84, 1997.

WEISINGER, R. S. et al. Angiotensin converting enzyme inhibition lowers body weight and improves glucose tolerance in C57BL/6J mice maintained on a high fat diet. **Physiology & Behavior**, v. 98, n. 1–2, p. 192–197, ago. 2009.

WEISINGER, R. S.; BEGG, D. P.; JOIS, M. Antagonists of the renin-angiotensin system and the prevention of obesity 165. **Curr.Opin.Investig.Drugs**, v. 10, n. 2040- 3429 (Electronic), p. 1069–1077, 2009.

XIAO, F. et al. Orexin A regulates cardiovascular responses in stress-induced hypertensive rats. **Neuropharmacology**, v. 67, p. 16–24, 2013.

XU, Z.; XINGHONG, J. Drinking and Fos-immunoreactivity in rat brain induced by local injection of angiotensin I into the subfornical organ. **Brain research**, v. 817, n. 1–2, p. 67–74, 30 jan. 1999.

YADAWA, A. K.; CHATURVEDI, C. M. Expression of stress hormones AVP and CRH in the hypothalamus of *Mus musculus* following water and food deprivation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 239, p. 13–20, dez. 2016.

YEH, L. F.; BAKER, S. P.; KATOVICH, M. J. Possible mechanism for increased beta-adrenergic dipsogenic response in food-deprived rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 251, n. 6, p. R1170–R1176, dez. 1986.

YOSHIDA, H. et al. Effects of Angiotensin II on Isolated Rabbit Afferent Arterioles. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 66, n. 4, p. 457–464, 1994.

YOSHIDA, T. et al. Angiotensin II Reduces Food Intake by Altering Orexigenic Neuropeptide Expression in the Mouse Hypothalamus. **Endocrinology**, v. 153, n. 3, p. 1411–1420, mar. 2012.

YOSTEN, G.; SAMSON, W. Separating Thirst from Hunger. In: DE LUCA, L. J.; MENANI, J.; JOHNSON, A. K. (Eds.). **Neurobiology of Body Fluid Homeostasis: Transduction and Integration**. 1. ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2014. p. 67–74.

YU, A. S. et al. Functional expression of SGLTs in rat brain. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 299, n. September 2010, p. C1277–C1284, dez. 2010.

YVAN-CHARVET, L. et al. Prevention of Adipose Tissue Depletion during Food Deprivation in Angiotensin Type 2 Receptor-Deficient Mice. **Endocrinology**, v. 147, n. 11, p. 5078–5086, nov. 2006.

ZIMMERMAN, C. A. et al. Thirst neurons anticipate the homeostatic. **Nature Publishing Group**, v. 537, n. 7622, p. 680–684, 2016.