

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE FISILOGIA CARDIOVASCULAR

**Efeitos da restrição alimentar sobre o sistema renina
angiotensina e sua influência nas respostas
cardiovasculares de ratas Fischer**

Aluna: Aline Maria Arlindo de Souza

Ouro Preto
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Efeitos da restrição alimentar sobre o sistema renina angiotensina e sua influência nas respostas cardiovasculares de ratas Fischer

ALUNA: Aline Maria Arlindo de Souza
ORIENTADOR: Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Jr
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

Ouro Preto
2017

S895e

Souza , Aline Maria Arlindo de.

Efeitos da restrição alimentar sobre o sistema renina angiotensina e sua influência nas respostas cardiovasculares de ratas Fischer [manuscrito] / Aline Maria Arlindo de Souza . - 2017.

xii, 71pf.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Jr .

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Dieta na doença. 2. Angiotensina. 3. Pressão arterial. 4. Ratos. I. Chianca Jr , Deoclécio Alves . II. Menezes, Rodrigo Cunha Alvim de . III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.12-008.33

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



NUPEB

Ata da Banca Examinadora de Defesa de Tese Intitulada:

"Efeitos da restrição Alimentar sobre o sistema renina angiotensina e sua influência nas respostas cardiovasculares de ratas Fischer".

Aos oito dias do mês de junho de 2017, às 09 horas, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese da aluna Aline Maria Arlindo De Souza. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:



Prof.^a Dr.^a Maria Lucia Pedrosa
Examinadora (UFOP)



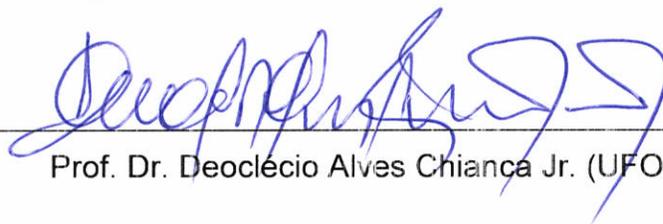
Prof. Dr. Frank Silva Bezerra
Examinador (UFOP)



Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga
Examinador (UFPB)



Prof. Dr. Rubens Fazan Júnior
Examinador (USP)



Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Jr. (UFOP)

DATA DA DEFESA: **08/06/2017**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NUPEB - Bloco I, Universidade Federal de Ouro Preto Campus Universitário
Morro do Cruzeiro / CEP 35.400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil - Tel: 55 (31) 3589.16x1
E-mail: cbiol@nupeb.ufop.br / www.nupeb.ufop.br/biol



Apoio financeiro

Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Fisiologia Cardiovascular** do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade de Ouro Preto, com financiamento da CAPES, CNPq, FAPEMIG e UFOP e no ***Center for the Study of Sex Differences in Health, Aging and Disease*** no Departamento de Medicina da *Georgetown University* com o auxílio da CAPES e NIH 1R01HL119.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, Miria Arlindo e Admir de Souza, por acreditarem na educação e me incentivarem há cada dia a continuar minha formação.

Aos meus orientadores, Prof. Dr Rodrigo Cunha Alvim de Menezes por me adotar como aluna e comprar essa batalha, além dos ensinamentos e discussões; Prof Dr Deoclécio Alves Chianca Jr, por acreditar em mim e abrir as portas do laboratório onde tudo se iniciou.

Ariane, minha irmã, obrigada pela paciência, convivência e apoio durante todo esse tempo;

Tiago, obrigada pelo apoio, companheirismo e cumplicidade;

Minhas queridas fiéis companheiras de labuta, Ms Aline Rezende, Ms Laura Batista, Ms Glenda Viggiano, Ms Sylvanna Noronha e Ms Fernanda S. Silva, obrigada pelo apoio nas horas de crise, ajuda na execução dos experimentos e discussões. Sem vocês o caminho para realização desse trabalho teria sido mais árduo e longo.

Todos (ex) integrantes do laboratório de Fisiologia Cardiovascular (LFC) que de alguma maneira também contribuíram para que este trabalho fosse possível de se realizar.

Todos do Laboratório de Imunoparasitologia (LIP) pela amizade e ensinamentos, em especial Prof. Dr Luis Carlos Afonso Crocco;

Aos funcionários do LFC, Milton de Paula e Marly Lessa, e aos funcionários do NUPEB que sempre estavam dispostos em ajudar, sempre com muita dedicação.

Lilian e Érica, do CCA – Centro de Ciência Animal, obrigada pela atenção e paciência;

Thank you, Dr Sandberg from Georgetown University - Washington - DC - USA, for accept me as a lab member, for the lessons and opportunity to grow as a researcher. My lab mates, Ms Amrita Pai and Ms Parnika Kadam, thank you for the help and support since the first day that we met. Dr West, thank you for the discussions, I learned a lot. Thank you, Dr Speth from NOVA University - Fort Lauderdale - FL - USA for accept me in your lab and teach me new techniques and lessons. Hong Ji, Xie Wu and all the lab team, thank you for the help and support during all this time;

Obrigada aos membros da banca por aceitarem o convite e contribuírem para a melhoria desse trabalho.

Esse trabalho jamais seria possível de ser realizado sem a participação de todos vocês.

Obrigada!!!

Sumário

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 RESTRIÇÃO ALIMENTAR	14
1.2 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA.....	16
1.2.1 <i>Descoberta</i>	16
1.2.2 <i>Angiotensinogênio</i>	18
1.2.3 <i>Angiotensina-[1-8]</i>	18
1.2.4 <i>Outros peptídeos do sistema renina angiotensina</i>	19
1.2.5 <i>Principais enzimas associadas ao SRA</i>	20
1.2.6 <i>Receptores do sistema renina angiotensina</i>	22
2. OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL - RESTRIÇÃO ALIMENTAR	29
3.2 FÁRMACOS E SOLUÇÕES.....	29
3.3 CONFECÇÃO DOS MATERIAIS UTILIZADOS	30
3.4 CIRURGIAS E PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE CARDIOVASCULAR.....	31
3.5 CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS	32
3.6 REGISTROS E ANÁLISES DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC).....	32
3.7 PROCEDIMENTO PARA INFUSÃO DE DROGAS.....	32
3.8 CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR NO PERFIL HEMODINÂMICO	34
3.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS PEPTÍDEOS DO SRA	35
3.10 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA ECA, ECA2 E RENINA	36
3.11 DETERMINAÇÃO DOS RECEPTORES DE ANGIOTENSINA	37
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
4. RESULTADOS	39
4.1 PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E HEMODINÂMICOS	39
4.2 EFEITO DA RA SOBRE A RESPONSABILIDADE À ANG-[1-10]	39
4.3 EFEITO DA RA SOBRE A RESPONSABILIDADE À ANG-[1-8]	40
4.4 EFEITO DA RA SOBRE A RESPONSABILIDADE À ANG-[1-7]	41
4.5 EFEITO DA RA NA ATIVIDADE PLASMÁTICA DA ECA, ECA2 E RENINA	42
4.6 EFEITO DA RA NA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DOS PEPTÍDEOS DE ANGIOTENSINA E ANGIOTENSINOGENIO.....	44
4.7 EFEITO DA RA NA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES AT ₁ , AT ₂ E MAS NAS ARTÉRIAS MESENTÉRICAS	47
4.8 EFEITO DA RA NA RESPONSABILIDADE AO LOSARTAN (ANTAGONISTA DO RECEPTOR AT ₁)	48
4.9 EFEITO DA RA NA RESPONSABILIDADE À L-FENILEFRINA (AGONISTA DO RECEPTOR α_1 ADRENÉRGICO)	49
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÃO	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

Lista de figuras

- FIGURA 1:** A EVOLUÇÃO DO ENVELHECIMENTO E OS EFEITOS DA RA NA SOBREVIDA. ADAPTADO DE (13).
AL: *AD LIBITUM*; RA: RESTRIÇÃO ALIMENTAR.16
- FIGURA 2:** SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA SIMPLIFICADO. ABREVIações: ECA (2): ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA (2); MAS R, RECEPTOR MAS; DAP: ASPARTYL AMINOPEPTIDASE; NEP: ENDOPEPTIDASE NEUTRA; PEP: PROLIL ENDOPEPTIDASE; (P)RR: RECEPTOR PRORENIN; TOP: THIMET OLIGOPEPTIDASE. AMP-A: AMINOPEPTIDASE A; AMP: AMINOPEPTIDASE N. FIGURA ADAPTADA DE (38, 84, 85).22
- FIGURA 3:** ESQUEMA SIMPLIFICADO DA CANULAÇÃO DA ARTÉRIA (VERMELHO) E DA VEIA (AZUL) FEMORAL (128).32
- FIGURA 4:** EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR NOS EFEITOS DA ANG-[1-10] SOBRE A PAM E FC. COMPARAÇÃO DA VARIAÇÃO DA PAM (A) E FC (B) NO DECORRER DO TEMPO E COMPARAÇÃO DA ALTERAÇÃO MÁXIMA OBTIDA PARA A PAM (C) E FC (D) APÓS INFUSÃO IV DE ANG-[1-10] EM RELAÇÃO AOS VALORES BASAIS ANTERIORES AO VEÍCULO (VEI) E CAPTOPRIL (CAP) EM RATAS CONTROLE (CT) E SUBMETIDAS À RESTRIÇÃO ALIMENTAR (RA) (N=7/GRUPO). *P<0,05 vs. CT ATRAVÉS DO TESTE DE ANOVA TWO-WAY ANOVA SEGUIDO DO TESTE DE BONFERRONI (TEMPO; DIETA). #P<0,001 vs. VEÍCULO, MESMO GRUPO ATRAVÉS DA ANÁLISE NÃO PAREADA E TESTE T DE *STUDENT* E ‡P<0,002 vs. CT, MESMO TRATAMENTO, ATRAVÉS DO TESTE DE VARIÂNCIA ANOVA TWO WAY, SEGUIDO DO PÓS TESTE DE BONFERRONI.40
- FIGURA 5:** EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR NOS EFEITOS DA ANG-[1-8] SOBRE A PAM E FC. COMPARAÇÃO DA VARIAÇÃO DA PAM (A) E FC (B) NO DECORRER DO TEMPO E COMPARAÇÃO DA ALTERAÇÃO MÁXIMA OBTIDA PARA A PAM (C) E FC (D) APÓS INFUSÃO IV DE ANG -[1-8] EM RELAÇÃO AOS VALORES BASAIS EM RATAS CONTROLE (CT) SUBMETIDAS À RESTRIÇÃO ALIMENTAR (RA) (N=8/GRUPO). *P<0,0001 vs. CT ATRAVÉS DO TESTE DE ANOVA TWO-WAY ANOVA SEGUIDO DO TESTE DE BONFERRONI (TEMPO; DIETA). #P<0,01 vs. VEÍCULO, MESMO GRUPO ATRAVÉS DA ANÁLISE NÃO PAREADA E TESTE T DE *STUDENT* E ‡P<0,0001 vs. CT, MESMO TRATAMENTO, ATRAVÉS DO TESTE DE VARIÂNCIA ANOVA TWO WAY, SEGUIDO DO POS TESTE DE BONFERRONI.41
- FIGURA 6:** EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR NOS EFEITOS DA ANG-[1-7] SOBRE A PAM E FC. COMPARAÇÃO DA VARIAÇÃO DA PAM (A) E FC (B) NO DECORRER DO TEMPO E COMPARAÇÃO DA ALTERAÇÃO MÁXIMA OBTIDA PARA A PAM (C) E FC (D) APÓS INFUSÃO IV DE ANG-[1-7] EM RELAÇÃO AOS VALORES BASAIS EM RATAS CONTROLE (CT) E SUBMETIDAS À RESTRIÇÃO

ALIMENTAR (RA) (N=9-10/GRUPO). *P<0,05 vs. CT ATRAVÉS DO TESTE DE ANOVA TWO-WAY ANOVA SEGUIDO DO TESTE DE BONFERRONI (TEMPO; DIETA).....	42
FIGURA 7: EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR NA ATIVIDADE DA RENINA, ECA E ECA2 EM AMOSTRAS DE PLASMA. COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE PLASMÁTICA DA RENINA (P=0,9242) (A) (N=10-7/GRUPO), VELOCIDADE DA FORMAÇÃO DE SUBSTRATO DA ECA (B) (N=8/GRUPO) E ECA2 (D) (N=8/GRUPO) E CURVA REPRESENTATIVA DA FORMAÇÃO DE SUBSTRATO NO DECORRER DO TEMPO DA ECA (C) E ECA2 (E) EM RATAS CONTROLE (CT) E SUBMETIDAS À RESTRIÇÃO ALIMENTAR (RA). RAZÃO DA FORMAÇÃO DA ANG-[1-10] PARA AGT (P=0,3631) (F), ANG-[1-8] PARA AGT (P=0,4750) (G) E ANG-[1-8] PARA ANG-[1-10] (P=0,0330) (H). *P<0,001 vs. CT ATRAVÉS DO TESTE DE ANOVA TWO-WAY SEGUIDO DO TESTE DE BONFERRONI (TEMPO; DIETA); †P<0,05 vs. CT, MESMO TRATAMENTO ATRAVÉS DO TESTE T DE <i>STUDENT</i> . PRA: PLASMA RENIN ACTIVITY; ATIVIDADE PLASMÁTICA DA RENINA.	43
FIGURA 8: EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR NA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DOS PEPTÍDEOS DE ANGIOTENSINA E ANGIOTENSIONEGÊNIO. COMPARAÇÃO CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE AOPEN APÓS INFUSÃO DE VEÍCULO OU ANG-[1-10] (A) (N=8/GRUPO), CONCENTRAÇÃO DOS PEPTÍDEOS DE ANGIOTENSINA APÓS INFUSÃO IV DE VEÍCULO NO GRUPO CONTROLE (B) E RESTRIÇÃO ALIMENTAR (C) (N=10-11/GRUPO) E CONCENTRAÇÃO DOS MESMOS PEPTÍDEOS APÓS INFUSÃO IV DE ANG-[1-10] (D E E) (N=8/GRUPO). †P=0,0001 vs. CT, MESMO TRATAMENTO ATRAVÉS DO TESTE DE VARIÂNCIA ANOVA <i>TWO WAY</i> SEGUIDO DO POST TESTE DE BONFERRONI; #P<0,05 vs. VEÍCULO, MESMO GRUPO ATRAVÉS DO TESTE T DE <i>STUDENT</i> , NÃO PAREADO.	46
FIGURA 9: EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR NO RNAM DOS RECEPTORES AT ₁ , AT ₂ E MAS NAS ARTÉRIAS MESENTÉRICAS. COMPARAÇÃO DA VARIAÇÃO NA EXPRESSÃO DOS RNAM DOS RECEPTORES AT ₁ (A), AT ₂ (B) E MAS (C) EM RATAS CONTROLE (CT) E SUBMETIDAS À RESTRIÇÃO ALIMENTAR (RA) (N=8-9/GRUPO) †P<0,006 vs. CT ATRAVÉS DA ANÁLISE NÃO PAREADA E TESTE T DE <i>STUDENT</i>	48
FIGURA 10: EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR NOS EFEITOS DO BLOQUEIO DO RECEPTOR AT ₁ SOBRE A PAM E FC. COMPARAÇÃO DA VARIAÇÃO DA PAM (A) E FC (B) NO DECORRER DO TEMPO E COMPARAÇÃO DA ALTERAÇÃO MÁXIMA OBTIDA PARA A PAM (C) E FC (D) APÓS INFUSÃO IV DE LOSARTAN EM RELAÇÃO AOS VALORES BASAIS EM RATAS CONTROLE (CT) SUBMETIDAS À RESTRIÇÃO ALIMENTAR (RA) (N=9-10/GRUPO). *P<0,0001 vs. CT ATRAVÉS DO TESTE DE ANOVA TWO-WAY ANOVA SEGUIDO DO TESTE DE BONFERRONI (TEMPO; DIETA). #P<0,05 vs. VEÍCULO, MESMO GRUPO ATRAVÉS DA ANÁLISE NÃO PAREADA E TESTE T DE <i>STUDENT</i> E †P<0,0001 vs. CT, MESMO TRATAMENTO, ATRAVÉS DO TESTE DE VARIÂNCIA ANOVA <i>TWO WAY</i> , SEGUIDO DO POST TESTE DE BONFERRONI.	49

FIGURA 11: EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR NA ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES α 1-ADRENÉRGICOS SOBRE A PAM E FC. COMPARAÇÃO DA VARIAÇÃO DA PAM (A) E FC (B) NO DECORRER DO TEMPO E COMPARAÇÃO DA ALTERAÇÃO MÁXIMA OBTIDA PARA A PAM (C) E FC (D) APÓS INFUSÃO IV DE L-FENILEFRINA EM RELAÇÃO AOS VALORES BASAIS EM RATAS CONTROLE (CT) SUBMETIDAS À RESTRIÇÃO ALIMENTAR (RA) (N=9/GRUPO). *P<0,001 vs. CT ATRAVÉS DO TESTE DE ANOVA TWO-WAY ANOVA SEGUIDO DO TESTE DE BONFERRONI (TEMPO; DIETA). ‡P<0,05 vs. CT, MESMO TRATAMENTO, ATRAVÉS DO TESTE DE VARIÂNCIA ANOVA TWO WAY, SEGUIDO DO PÓS TESTE DE BONFERRONI.....50

Lista de tabelas

TABELA 1: EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR SOBRE OS PARÂMETROS HEMODINÂMICOS E FISIOLÓGICOS.....	39
TABLE 2: EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR NA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DOS PEPTÍDEOS DO SISTEMA RENINA-ANGOTENSINA ANTES E APÓS INFUSÃO IV. DE ANG-[1-10].....	47

Lista de abreviaturas

aa: aminoácido;
ACE: angiotensin converting enzyme;
AGT: Angiotensinogênio;
AMP-A: Aminopeptidase A;
AMP-N: Aminopeptidase N;
AN: Anorexia nervosa;
Ang: Angiotensin; angiotensina;
AT_{1a}R: Angiotensin type 1a receptor;
AT₂R: Angiotensin type 2 receptor;
BP: Blood pressure;
BW: Body weight;
CALERIE: Comprehensive Assessment of Long term Effects of Reducing Intake of Energy
Cap: Captopril;
CCA: Centro de Ciência Animal;
CT: Control;
CVLM: Bulbo ventrolateral caudal;
DAP: Aspartil aminopeptidase;
ECA: Enzima conversora de angiotensina;
ECA2: Enzima conversora de angiotensina 2;
FC: Frequência cardíaca;
FR: Food restriction;
HR: Heart rate;
IFN- γ : Interferon gama;
IL-6: Interleucina-6;
IRAP: Aminopeptidase regulada por insulina;
KO: Knockout;
LC-MS/MS: Cromatografia líquida e espectroscopia de massa em tandem;
LDL: Lipoproteína de baixa densidade;

MAP: Mean arterial pressure;
masR: mas receptor;
NEP: Endopeptidase neutral;
NTS: Núcleo do trato solitário;
P(RR): Receptor da pro-renina;
PAM: Pressão arterial média;
PAP: Pressão arterial pulsátil;
PBS: Tampão fosfato-salino;
PE: Polietileno;
PEP: Prolil endopeptidase;
PVN: Núcleo paraventricular do hipotálamo;
qPCR: Real-time polymerase chain reaction;
RA: Restrição alimentar;
RVLM: Bulbo ventrolateral rostral;
SHR: Rato espontaneamente hipertenso;
SRA: Sistema renina angiotensina;
TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa;
TOP: Thimet olipeptidase;
UCP: Uncoupling proteins;
Veh: Vehicle;

Resumo

Introdução: Insuficiência cardíaca, desregulação autonômica, hipotensão e bradicardia são problemas comuns nos casos de restrição alimentar (RA) severa e é bem estabelecido que o sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) é importante no controle da pressão arterial através da ação sobre vários órgãos. Entretanto pouco se sabe sobre o SRAA e sua influência nas respostas cardiovasculares na RA.

Objetivo: Nós avaliamos o efeito da RA na via metabólica da Ang-[1-8] na regulação da pressão arterial para investigar como a RA pode causar hipotensão enquanto simultaneamente aumenta a atividade do sistema nervoso simpático.

Metodologia e Resultados: Foram usadas ratas Fischer mantidas em dieta controle (CT), *ad libitum*, ou RA (60%) por 14 dias. O efeito da Ang-[1-8] sobre a pressão arterial média (PAM) foi menor nos animais com RA mesmo ocorrendo uma ativação maior da via metabólica da Ang-[1-8]. O metabolismo da Ang-[1-10] e seu precursor angiotensinogênio (AGT), foram aumentados pela RA como evidenciado pelo aumento da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) plasmática e elevada concentração de Ang-[1-8]. Após a infusão de Ang-[1-10], houve também aumento na concentração de AGT e na conversão da Ang-[1-10] para outros metabólitos de angiotensina incluindo Ang-[2-10], Ang-[2-8] e Ang-[3-8]. Embora a Ang-[1-8] causou uma resposta pressora menor na RA, foi encontrado que o RNAm para o receptor AT₁ foi aumentado em vasos mesentéricos enquanto nenhuma alteração foi observada na expressão dos receptores AT₂ e Mas. Além da expressão, a responsividade do receptor AT₁ na RA foi aumentada após infusão de losartan. Entretanto, após infusão de fenilefrina, a amplitude da resposta pressora foi a mesma que a observada no grupo CT.

Conclusão: Nossos resultados sugerem que as vias metabólicas da angiotensina estão ativadas constantemente no modelo de RA aumentando a concentração plasmática da Ang-[1-8] e seus peptídeos *downstream* em compensação a hipotensão, bradicardia e hipovolemia.

Abstract

Rationale: Heart failure, autonomic imbalance, hypotension and bradycardia are common problem in anorexia nervosa (AN) and is well known that the angiotensin system is important to control the blood pressure through many organs, however nothing is known about the angiotensin (Ang) system and its influence in the cardiovascular responses in AN.

Objective: We examined the effect of food restriction (FR) on Ang-[1-8] metabolic pathways in blood pressure regulation to investigate how FR can cause hypotension while simultaneously increasing the sympathetic nervous system.

Methods and Results We used female Fischer rats maintained on a control (CT) or severe FR (60%) diet for 14 days. The mean arterial pressure (MAP) response to Ang-[1-8] was attenuated in FR rats even though the systemic Ang-[1-8] metabolic pathway was activated. Metabolism of Ang-[1-10] and its precursor, angiotensinogen, were increased by FR as evidenced by increased plasma angiotensin converting enzyme (ACE) activity and elevated plasma Ang-[1-8] and angiotensinogen levels before and after Ang-[1-10] infusion. There was also increased conversion of Ang-[1-10] to other angiotensin metabolites including Ang-[2-10], Ang-[2-8] and Ang-[3-8]. Although Ang-[1-8] causes a lower MAP response, we found that AT₁R mRNA expression was increased in mesenteric vessels whereas no differences were observed in the mRNA expression of angiotensin type 2 receptor (AT₂R) and mas receptor (masR). Furthermore, the AT₁ blockage with losartan caused a higher depressor effect in FR, even no difference was seen in the maximum BP response with phenylephrine infusion.

Conclusions: Our results suggest that angiotensin metabolic pathways are constantly activated in FR model to increase the Ang-[1-8] and its downstream peptides in order to compensate for the hypotension, bradycardia and hypovolemia.

1. Introdução

1.1 RESTRIÇÃO ALIMENTAR

Restrição alimentar (RA) é uma intervenção dietética na qual a ingestão de calorias e/ou nutrientes é reduzida abaixo do normal consumido *ad libitum*. Essa redução pode ocorrer em diferentes proporções e quantidades ocasionando diferentes consequências ao organismo. A restrição de alimentos pode acontecer por diferentes razões, uma delas é por fatores psicológicos como no caso da anorexia nervosa. Nesse caso os pacientes, por influência da mídia e/ou por alterações psicológicas começam a apresentar distorções da imagem corporal, medo excessivo de ganhar peso, começam a rejeitar o alimento ou reduzem drasticamente sua ingestão (1). Outra situação patológica em que ocorre a redução na ingestão de alimentos é no caso de pacientes com AIDS que não estão sob tratamento (2) ou pacientes com câncer durante o tratamento de quimioterapia no qual os fármacos utilizados interferem no apetite e paladar (3). Existe ainda a restrição de alimentos que ocorre em consequência ao escasso acesso ao mesmo, seja por fatores ambientais como seca ou sociais como guerras e pobreza (4, 5).

Independente dos motivos que ocasionam a restrição alimentar, muitos trabalhos veem estudando as consequências para o organismo do simples fato de reduzir a ingestão de alimentos. Ultimamente um tópico muito estudado é a RA e sua influencia na longevidade e prevenção de doenças. Em 1935 foi publicado o primeiro estudo sobre esse assunto, o qual observou que após reduzir 20% da ingestão alimentar de ratos, os mesmos apresentaram um aumento na sobrevivência de quase 69% para machos e 3% para fêmeas (6). Posteriormente, outro estudo utilizando macacos Rhesus encontrou que após 30% de redução na ingestão alimentar diária por 20 anos diminuiu a incidência de doenças relacionadas ao envelhecimento como diabetes, câncer e atrofia cerebral (7). Um dos efeitos da RA em mamíferos é a redução do aparecimento de câncer devido a possível inibição da proliferação celular e aumento da apoptose (8) ou ainda a RA aumenta a eficiência dos mecanismos de reparo de DNA e reduz os danos oxidativos (9).

Recentemente um estudo translacional foi iniciado na tentativa de entender os efeitos da RA no ser humano. Esse estudo começou em 2007 e chama-se CALERIE (*Comprehensive Assessment of Long term Effects of Reducing Intake of Energy*). Ele tem como objetivo avaliar os efeitos bioquímicos e fisiológicos da restrição calórica, mantendo a

necessidade mínima de nutrientes requerida pelo organismo de indivíduos eutróficos. Os resultados preliminares são publicados constantemente e dentre alguns achados encontra-se: redução do peso corporal em 10% após 6 meses de 25% de restrição calórica e melhora nos marcadores de risco cardiovascular e de diabetes (10). Outro estudo avaliando os efeitos cardíacos após a RA observou que camundongos machos quando receberam 30% a menos de comida por 7 dias, houve um efeito cardioprotetor sendo menores as ocorrências de complicações do infarto do miocárdio (11). No caso de pacientes obesos a RA possui inúmeros efeitos benéficos associados ao sistema cardiovascular. Esses efeitos foram demonstrados no trabalho de revisão de Garcia-Prieto (2016), o qual mostrou uma melhora do perfil lipídico, redução da pressão arterial e no remodelamento vascular (12).

Com o passar dos anos e o crescente número de pesquisas sobre RA começou-se a observar que diferentes quantidades calóricas ou de nutrientes consumidos influenciavam na resposta do organismo. A partir do momento que iniciou a comparação entre a composição de dietas, foi possível observar que algumas espécies, quando em situação de baixo consumo alimentar, apresentavam término precoce da fase reprodutiva. De maneira oposta, outras espécies apresentam vida longa e fértil em resposta a redução na ingestão de alimentos (13). Outros estudos também relatam que a RA pode não afetar a longevidade e sim reduzir o tempo de vida, como no caso de borboletas, moscas, fungos e camundongos (14).

Levando em consideração a variabilidade de resposta entre espécies e as inúmeras possibilidades de modelos de RA, foi necessário definir limites e padrões de respostas. Essa divisão, de uma forma simples, consiste em dividir os tipos de RA que geram efeitos benéficos e os tipos que geram efeitos maléficos ao organismo. Muitos trabalhos relatam que essa redução de alimentos sem comprometer o aporte de nutrientes essenciais estaria em torno de 20-40% de redução na ingestão média diária (15). Na verdade, independente do percentual utilizado para RA, o fator mais importante é considerar se a RA para aquele indivíduo está causando má nutrição ao organismo. Nesse caso, o indivíduo não terá efeitos benéficos como longevidade (16) (Figura 1).

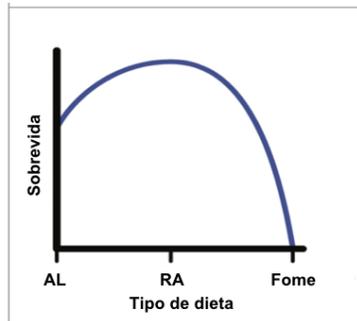


Figura 1: A evolução do envelhecimento e os efeitos da RA na sobrevida. Adaptado de (13). AL: Ad libitum; RA: restrição alimentar.

Em contrapartida, protocolos de RA envolvendo desnutrição além de comprometerem o tempo de vida, causam efeitos deletérios ao sistema cardiovascular. Em protocolos alimentares com 50-60% de redução na ingestão diária de ratos, mostraram que a dieta ocasionou hipotensão, bradicardia, diminuição da contração cardíaca (+dP/dt) e diminuição do relaxamento do ventrículo esquerdo (-dP/dt), disfunção do miocárdio e aumento de epinefrina e noraepinefrina no tecido cardíaco (17, 18). Além disso, em estudos realizados em nosso laboratório, publicados recentemente (19), demonstram que o modelo de restrição alimentar de 60% durante 14 dias causou uma diminuição no peso corporal, desnutrição, alto catabolismo proteico, diminuição do colesterol total e LDL, hipotensão, bradicardia e anestro. Também foram observadas alterações após experimentos no sistema nervoso simpático com α e β bloqueadores, como maior responsividade dos receptores α_1 adrenérgicos. Assim, sabendo das complicações no sistema cardiovascular decorrente da RA, o foco desse trabalho foi estudar as vias envolvidas com o controle da pressão arterial e frequência cardíaca, como o sistema renina angiotensina.

1.2 Sistema renina angiotensina

1.2.1 Descoberta

O sistema renina angiotensina (SRA) é um dos principais mecanismos humoral responsável pelo controle das funções cardiovasculares e do equilíbrio hidroeletrólítico, tendo um grande efeito sobre a pressão arterial em longo prazo. A hiperatividade desse sistema na circulação sanguínea e em diferentes tecidos está relacionada com o desenvolvimento e a manutenção de doenças cardiovasculares, entre elas a hipertensão arterial (20).

Esse sistema começou a ser descoberto em 1898 quando Tigerstedt e Bergman realizaram diversos experimentos. Um dos experimentos era fazer um extrato renal de coelho e o injetar por via intravenosa em outro coelho com o propósito de observar modificações na pressão arterial. Após alguns testes eles puderam concluir que o extrato de rim possuía algo que era solúvel em água e álcool e possuía um efeito pressor. Também observaram que esse efeito era perdido quando o extrato era preparado a partir da medula renal ou quando a amostra era aquecida. Assim, através de alguns experimentos eles descreveram pela primeira vez uma substância produzida pelo rim, com coloração castanha, que possuía um efeito pressor e passaram a chamá-la de renina (171).

Quase 40 anos se passaram e pouquíssimos relatos foram feitos sobre essa grande descoberta, sendo quase esquecida até ser novamente discutida em estudos de 1934 (21). Após alguns anos, pesquisadores começaram a avaliar o efeito da renina quando incubada com globulinas do sangue. Observaram que a renina na presença de globulinas ocasionava um aumento na pressão arterial. A partir disso, foi sugerido pela primeira vez que a renina era uma enzima e que seu substrato era uma proteína presente no sangue. Outra importante definição também feita a partir desse trabalho foi a identificação do produto da renina, chamado a partir de então de "*hypertensin*" (22). Dez anos após este relato, Leonard Skeggs e colaboradores na tentativa de purificar "*hypertensin*" acabaram isolando duas substâncias pressoras, ao invés de uma. O achado inesperado mostrou que a substância pressora inicial, chamada de *hypertensin I*, era formada a partir da ação da renina sobre seu substrato, o qual era convertido rapidamente em um segundo substrato que possuía resposta pressora aproximada a *hypertensin I*. Esse segundo substrato foi chamado de *hypertensin II*, o qual futuramente veio a ser chamado de angiotensina (23). Outro fato histórico importante foi a descoberta de que havia outra enzima presente no plasma que produzia *hypertensin II* (24). Dessa forma, em 1955 foi a primeira vez que descreveram a enzima conversora de *hypertensin*, ou seja, a enzima que converte *hypertensin I* em *hypertensin II*, atualmente conhecida como enzima conversora de angiotensina (ECA) (25).

Com essas descobertas o sistema renina angiotensina começou a ser definindo. Hoje sabe-se que esse sistema compreende em vários peptídeos, enzimas e receptores. Além disso, esse sistema não é mais considerado como um sistema sistêmico, mas sim local, pois todos os componentes requeridos para geração dos peptídeos de angiotensina foram detectados em células de múltiplos lugares no corpo. Assim iniciou-se a abordagem de um conceito de função intrócrina. A síntese de angiotensina passa a ocorrer além dos locais clássicos: rim (renina), fígado (angiotensinogênio), pulmão (ECA) (26). Um estudo que demonstrou essa produção local

de Ang foi em 1998 quando pesquisadores queriam determinar se a Ang-[1-10] e Ang-[1-8] cardíaca eram produzidas localmente ou derivadas da circulação. Após alguns experimentos puderam concluir que o coração pode manter sua produção (>90%) de Ang-[1-8] mesmo quando a concentração plasmática de Ang é suprimida. O mesmo efeito foi observado no rim (27, 28).

1.2.2 Angiotensinogênio

O angiotensinogênio (AGT), primeira proteína na via do SRA, é uma glicoproteína com 485 aminoácidos (aa), incluindo o peptídeo sinal composto por 33aa. A região N-terminal é o local onde a renina irá atuar para separar um peptídeo com 10 aminoácidos que será chamado de Ang-[1-10], também conhecido por Ang I (29). O AGT é produzido não somente por hepatócitos, mas também nos túbulos proximais do rim, no cérebro por astrócitos e em menor quantidade por neurônios (30, 31).

São vários os estímulos para secreção do AGT, por exemplo camundongos que receberam infusão de Ang-[1-8] apresentaram um aumento de 2x na concentração plasmática de AGT. Existe um mecanismo de feedback positivo da Ang-[1-8] sobre o AGT que é controlado por um balanço de feedback negativo sobre a renina, a enzima que limita a síntese dos peptídeos de angiotensina (32). O AGT pode também ter sua produção estimulada ou inibida pela Ang-[1-8] ou por citocinas como Interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6). A resposta de estimulação ou inibição vai depender de qual via de sinalização intracelular está sendo ativada (33, 34).

Outras enzimas, além da renina, foram relatadas exercerem um efeito sobre o AGT, como a catepsina G, proteinase 3, calicreína, elastase, tonina. No caso da catepsina G, esta pode agir sobre o AGT produzindo Ang-[1-8] ao invés da clássica conversão à Ang-[1-10] (35-37).

1.2.3 Angiotensina-[1-8]

A Ang-[1-8] é um dos principais peptídeos da via da angiotensina, composto por 8aa (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) e é considerada o composto mais bioativo da via. Como descrito anteriormente, a Ang-[1-8] pode ser sintetizada através da ação de proteases como renina, catepsinas, elastase sobre a Ang-[1-10], ou pela degradação do AGT diretamente à Ang-[1-8] através da ação de enzimas como elastase, catepsinas, tonina. Outra possível via de formação da Ang-[1-8] é através de uma via independente da ação da renina, porém ainda não foi

identificada a enzima responsável por essa reação (38). Essa via de formação compreende na degradação do AGT em Ang-[1-12] e este peptídeo por sua vez é degradado à Ang-[1-8] pela ação da ECA e quimases (39). Uma vez que Ang-[1-8] foi formada, esta torna-se susceptível à ação de enzimas como aminopeptidase A que irá convertê-la à Ang-[2-8] ou como é conhecida Ang III. A Ang-[2-8], por sua vez torna-se o substrato da aminopeptidase N sendo convertida à Ang-[3-8] ou como é classicamente chamada, Ang IV (40). Outra opção ainda de ação sobre a Ang-[1-8] é a conversão desse peptídeo à Ang-[1-7] através da ação da ECA2 (41) ou ainda pode ser convertida diretamente à Ang-[3-8] por ação da DAP.

A maioria dos efeitos da Ang-[1-8] são mediados por sua ligação a dois receptores acoplados à proteína G, receptor de angiotensina tipo 1 (AT₁) e tipo 2 (AT₂). Embora o receptor AT₂ seja conhecido por exercer efeitos opostos do receptor AT₁, muitos efeitos da Ang-[1-8] são mediados através da ativação do receptor AT₁ (42). Posteriormente nesse trabalho, cada receptor será descrito mais detalhadamente. Entretanto alguns dos efeitos periféricos da Ang-[1-8] incluem vasoconstrição com consequente disfunção endotelial (43), aumento na secreção e síntese de aldosterona (44). Em casos de insuficiência cardíaca, esse peptídeo em altas concentrações ocasiona disfunção diastólica do ventrículo esquerdo devido a indireta estimulação do sistema nervoso simpático pela angiotensina (45). Quando a Ang-[1-8] foi administrada de forma exógena em rins isolados e a constrição das arteríolas aferentes e eferentes foram medidas, pôde-se observar que ocorreu uma constrição dose-dependente em ambas arteríolas, com consequente redução no fluxo sanguíneo renal e na filtração glomerular (46). Outro importante efeito periférico da Ang-[1-8] é o controle da síntese e secreção da renina, a qual é reduzida em altas concentrações de Ang-[1-8] (47). Ang-[1-8] também foi demonstrada promover aumento na síntese de angiotensinogênio intra-renal (33), estimula a liberação de vasopressina pela hipófise posterior a qual ocasiona aumento na retenção de líquidos nos ductos coletores renais e ainda, a Ang-[1-8] está relacionada com o estímulo da sede (48).

1.2.4 Outros peptídeos do sistema renina angiotensina

A Ang-[1-10], um dos primeiros peptídeos da via a ser descoberto, é um peptídeo composto por 10aa (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu) que é formado através da remoção dos 10 últimos aa localizados na região C-terminal do AGT através da ação das enzimas renina, catepsina D ou elastase (49). A Ang-[1-10] por sua vez se torna substrato de diversas enzimas como a ECA, tonina, catepsina B e G. Essas enzimas convertem a Ang-[1-10] em Ang-[1-8] (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) após a remoção de 2 aa na região C-terminal (49, 50).

Outra possível conversão da Ang-[1-10] é através da ação da aminopeptidase A que converte esse peptídeo de 10 aa em um peptídeo com 8 aa, Ang-[2-10] (Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) que se torna em uma próxima reação o substrato da ECA, produzindo a Ang-[2-8] (Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) (51). Outra possibilidade ainda de degradação da Ang-[1-10] é sofrer a ação da ECA2 e ser convertida em Ang-[1-9] (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His) (52) ou por ação de outras três enzimas, endopeptidase neutra (NEP), thimet oligopeptidase (TOP) e prolil endopeptidase (PEP) ser convertida à Ang-[1-7] (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro) (53, 54).

O heptapeptídeo, Ang-[1-7], foi descoberto em 1988 após experimentos com homogenato de cérebro de cães (55). No entanto, a Ang-[1-7] foi considerada um peptídeo inativo do SRA por um longo tempo. Atualmente a Ang-[1-7] é considerada um componente importante do SRA podendo ser gerada a partir da Ang-[1-10] e Ang-[1-8], como descrito anteriormente, ou ainda através da conversão da Ang-[1-9] pela ECA ou NEP. Uma vez formada, a Ang-[1-7] pode ser hidrolisada pela ECA, formando Ang-[1-5] ou por aminopeptidases e DAP, originando Ang-[2-7] e Ang-[3-7], considerados peptídeos inativos até o momento (56-58).

De uma forma mais geral, sabe-se hoje que os peptídeos do sistema renina angiotensina atuam em diferentes receptores, que serão descritos posteriormente, porém resumidamente a Ang-[1-8] e Ang-[2-8] se ligam no receptor AT₁ ou AT₂, no caso da Ang-[1-8]. A Ang-[3-8] se liga no receptor AT₄, Ang-[1-7] no receptor Mas com indícios de ligação no receptor AT₂, renina e prorenina se ligam no receptor prorenina (38, 59) (Figura 2).

1.2.5 Principais enzimas associadas ao SRA

A renina, como descrita anteriormente, é uma enzima sintetizada na forma inativa, sendo essa forma chamada de pro-renina. A pro-renina pode ser sintetizada no rim, glândulas adrenais, retina, ovários, cérebro e testículos. Após a síntese do precursor da renina, o mesmo sofre uma transformação irreversível através da ação proteolítica nas células justaglomerulares renais e é armazenada até o momento da liberação (60). Alguns estudos vêm demonstrando que a renina também está presente em astrócitos. Um estudo utilizando cultura de neurônios hipotalâmicos encontrou marcação positiva para a proteína da renina em neurônios e astrócitos através de marcação com imunohistoquímica (61). Um diferencial no cérebro é que existem duas isoformas da renina, a que será secretada e a isoforma intracelular. A isoforma que é secretada parece ser dispensável na regulação cardiovascular (62) e pouco se sabe até o momento quais são os estímulos centrais para produção e liberação da renina no cérebro. Algumas hipóteses sugerem que o cérebro possui um mecanismo de formação de angiotensina diferente da via clássica, o

qual talvez possua uma síntese de peptídeos independente da renina e que as respostas estariam envolvidas com um receptor da renina, receptor pro-renina (51). No entanto, os estímulos para liberação da renina sistêmica ocorrem quando os barorreceptores renais detectam redução na pressão arterial, pressão de perfusão renal ou na concentração de sódio (63). A secreção de renina pode ser inibida quando há um aumento na pressão arterial ou quando há aumento da concentração de Ang-[1-8] por mecanismo de feedback negativo (64). Aumento na secreção de renina pode ser em resposta a estimulação dos receptores β -adrenérgico nas células justaglomerulares (65).

Enquanto a renina tem a expressão limitada a tecidos específicos, outra enzima chamada ECA pode ser encontrada em diversos lugares. Essa enzima é caracterizada como uma zinco metaloprotease transmembrana contendo dois sítios catalíticos ativos, ambos podendo ser inibidos por inibidores da ECA como o Lisinopril, porém a isoenzima presente em testículos, foi observada possuir somente um sítio catalítico ativo (66). A ECA pode ser encontrada nos ovários, testículos, intestino em especial no jejuno, coração, rim (67), na parede dos vasos sanguíneos, mais especificamente na superfície das células endoteliais (68) e células do sistema imunológico (69). A grande diferença da renina para a ECA é que a renina é uma enzima altamente específica, enquanto a ECA é promiscua, capaz de agir sobre diversos substratos (70). Além desses tecidos já citados, o RNAm da ECA foi encontrado em regiões do cérebro como plexo coroide, cerebelo, bulbo, hipocampo e hipófise (71, 72). Usando a técnica de autorradiografia pode-se observar altas concentrações da proteína ECA no plexo coroide, vasos sanguíneos, órgão suboficial da lamina terminal, área postrema, núcleo do trato solitário (NTS) e núcleo motor dorsal do vago (73). Já a ECA encontrada no sangue ou em fluídos biológicos é praticamente toda derivada de células endoteliais que, no caso do pulmão, seriam dos capilares pulmonares (74, 75) através da ação de enzimas proteolíticas da família das metaloproteases (76).

Além da ECA, em 2000 pesquisadores descobriram uma zinco metaloprotease homóloga a ECA, tendo 61% de homologia na sequência de aminoácidos e com alta expressão de RNAm no coração, rim, testículos e ovários, sugerindo uma possível contribuição com a homeostase da pressão arterial e fertilidade (77, 78). Essa enzima passou a ser chamada de ECA2. A ECA2 é uma enzima que fica na membrana celular e é altamente expressa em órgãos como rim e coração, sendo os pontos clássicos para regulação cardiovascular. No rim ela é encontrada principalmente nas arteríolas renais na túnica média, enquanto que a ECA é mais localizada na região endotelial (79). Entretanto nas bordas em escova dos túbulos proximais há co-localização da ECA e ECA2 (80). Outros tecidos com expressão da ECA2 são pulmão, fígado, sistema nervoso central (70,

Receptor pro-renina: Algumas enzimas no sistema renina-angiotensina possuem interação com receptores, como o caso da renina/pro-renina e seu receptor pro-renina (PPR). O PPR é um receptor que foi clonado em 2002 e possui um sítio de ligação para a renina e seu precursor pro-renina, sendo a afinidade para a pro-renina maior (86). Há hipóteses de que o receptor pro-renina funcione como um dímero, pois quando a renina se liga no receptor ela não é internalizada e nem degradada (87). O RNAm desse receptor pode ser encontrado em diversos tecidos como coração, cérebro, placenta, nas artérias e túbulos distais do rim, fígado e pâncreas (88, 89). Os mecanismos de ativação desse receptor ainda não estão totalmente caracterizados, porém sabe-se que o receptor da renina é capaz de iniciar um sinal intracelular pela ativação da via ERK1/ERK2 e também atua como cofator aumentando a eficiência de quebra do AGT pela ligação renina-receptor. Além disso o receptor da renina pode facilitar a geração e atuação da Ang-[1-8] na superfície celular (90).

O PPR foi demonstrado estar envolvido com a indução de glomeruloesclerose (91) e sua ativação independente de Ang-[1-8] em células HEK promoveu formação de fibrose (92). No caso do cérebro o bloqueio do PPR foi relacionado com redução da pressão arterial e do tônus simpático para o coração e para o vaso, houve também redução da expressão do receptor AT₁ e nos níveis de vasopressina (93). Outra funcionalidade observada no SNC do PPR foi que sua super-expressão no SON estimula a secreção de vasopressina e altera o balanço hídrico de ratos normais, além disso sua deleção diminuiu a PAM e FC de ratos espontaneamente hipertensivos (SHR) (94). Muitos estudos ainda precisam ser feitos para melhor compreensão dos efeitos desse receptor no sistema renina-angiotensina-aldosterona.

Receptor AT₁: Lin e Goodfriend em 1970, após incubarem a suprarrenal com o radioligante Ang-[1-8], descreveram o primeiro receptor funcional para a Ang-[1-8]. O receptor de angiotensina tipo 1 ou AT₁ é um receptor com 7 alças transmembrana da família de receptores acoplados a proteína G. Em 1992, pesquisadores conseguiram pela primeira vez identificar dois distintos genes para o receptor AT₁ em ratos, designados de AT_{1A} e AT_{1B}. O gene do receptor AT_{1B} apresentou ser 94% idêntico ao receptor AT₁ de vasos sanguíneos de ratos e 91% idêntico ao receptor presente na suprarrenal de bois (95). Devido a grande semelhança entre os receptores AT_{1A} e AT_{1B} é muito difícil distingui-los baseado somente em suas propriedades de interação com outras proteínas e sinalização intracelular, tornando-se praticamente impossível a produção de anticorpos e ligantes específicos à cada um. A alternativa para esse problema é a utilização de *probes* baseados na sequência do RNAm. A expressão de RNAm para ambos receptores foi avaliada e observou-se que o subtipo AT_{1A} predominou no fígado, pulmão, aorta e todos os segmentos do néfron com

exceção dos glomérulos. O subtipo AT_{1B} é quase que exclusivamente expresso na hipófise anterior. Ambos receptores são expressos em proporções iguais na zona glomerulosa da supra renal e nas células mesangiais do glomérulo renal (96).

Após a Ang-[1-8] ou Ang-[2-8] se ligarem no receptor AT₁, o mesmo sofre mudanças conformacionais que promovem a interação com a proteína G ou β -arrestins que desencadeiam diferentes respostas de sinalização intracelular (97). As respostas associadas ao receptor AT₁ são inúmeras e influenciam quase todos os sistemas do corpo. Inicialmente os efeitos desse receptor eram restritos a regulação do apetite ao sódio e sede, porém com o decorrer das pesquisas foi observado que algumas respostas eram específicas ao tecido em questão (98). No sistema vascular, a estimulação do receptor AT₁ altera a resposta vascular e hemodinâmica causando vasoconstrição e conseqüente aumento da pressão arterial que a longo prazo se associa ao desenvolvimento de hipertensão (99). Se caso a estimulação ocorrer nos receptores localizados na supra renal, haverá liberação de aldosterona que irá estimular o transporte de sódio (100); no rim a ativação do receptor AT₁ está associada com a contribuição do desenvolvimento de doenças crônicas renais, albuminúria e injúria renal (101).

Receptor AT₂: O receptor AT₂ é um receptor com estrutura semelhante ao AT₁, eles possuem uma semelhança em torno de 34% na sequência de aminoácidos e o receptor AT₂ também é acoplado a proteína G e possui 7 alças transmembrana (102). Esse receptor é altamente expresso em tecido fetal e tem sua expressão reduzida drasticamente após o nascimento, sugerindo que ele seja importante no desenvolvimento fetal (103). No tecido adulto, o receptor AT₂ é expresso principalmente em vasos de resistência de ratos (104), no rim sendo mais específico nas células epiteliais, túbulos corticais e células intersticiais (105), no coração, supra renal, ovários (106) e cérebro. No cérebro sua expressão acontece predominantemente durante a fase embrionária, já na vida adulta sua expressão fica restrita a algumas regiões encefálicas que possuem funções cognitivas, de comportamento e locomoção (107). Em um estudo onde marcaram o RNAm dos receptores de angiotensina, foi possível observar que o receptor AT₂ possuía uma distribuição mais abrangente no cérebro (108).

Em contraste com o receptor AT₁, o receptor AT₂ foi observado não sofrer internalização em resposta ao seu agonista, permanecendo na membrana celular após sua ativação com possível não dessensitização em respostas a longo prazo (120). Os efeitos da ativação do receptor AT₂ normalmente são contra-regulatórios aos efeitos do receptor AT₁, ou seja, após sua estimulação foi observado efeito antiproliferativo e pró-apoptótico em células do endotélio vascular (109), vasodilatação (110) e diminuição da hipertrofia cardíaca (111). Entretanto os

efeitos e a via de sinalização do receptor AT₂ ainda não são claros e muitos estudos encontram resultados contraditórios. Em 1996 um estudo realizado com ratos tratados por 3 semanas com Ang-[1-8] ou veículo na presença ou ausência do antagonista do receptor AT₂ observou que o bloqueio crônico do receptor AT₂ não afetou a concentração plasmática de Ang-[1-8] e a reatividade vascular. Outro significativo achado foi que o bloqueio crônico do receptor AT₁ junto com infusão de Ang-[1-8] resultou em níveis normais de pressão arterial, porém com desenvolvimento de hipertrofia cardíaca e fibrose (112).

Um fato interessante entre os receptores AT₁ e AT₂ é a possibilidade da formação de heterodímeros. O receptor AT₂ pode se ligar diretamente ao receptor AT₁ e antagonizar suas funções, inibindo a funcionalidade do receptor AT₁. Esse mesmo mecanismo foi demonstrado em células transfectadas, fibroblasto fetal e biopsia de miométrio de gestantes (113).

Receptor AT₄: O receptor AT₄ foi descoberto em 1992 no hipocampo de cobaia e foi caracterizado como o receptor com alta afinidade pelo peptídeo Ang-[3-8] (114). Porém, posteriormente foi observado que o mesmo receptor é uma amino peptidase regulada por insulina acabou sendo chamado de IRAP (115). Esse receptor foi identificado em diferentes tecidos como vasos sanguíneos, rim, intestino, suprarrenal, próstata e algumas regiões do cérebro relacionadas ao processamento da memória e com importância no controle motor (116). Um dos efeitos mais marcantes do receptor AT₄ é na resposta da memória. Em um estudo com infusões crônicas do agonista do receptor AT₄ no ventrículo lateral foi demonstrado uma melhora na memória espacial de ratos (117). No rim pouco se sabe sobre o efeito do receptor AT₄. Em um estudo com rim de ratos foi observado a presença desse receptor no corpo celular e na membrana apical dos túbulos proximais convolutos, no córtex renal e na medula. Assim como a Ang-[3-8] diminuiu o transporte de sódio nos túbulos proximais (118). Em um estudo, o qual avaliaram o efeito da Ang-[3-8] na disfunção cardíaca induzida por Ang-[1-8], observaram que Ang-[3-8] via receptor IRAP melhorou a disfunção cardíaca, inibiu a apoptose e a hipertrofia de cardiomiócitos, assim como também inibiu a síntese de colágeno (119). Outra função do receptor AT₄ é em relação ao metabolismo energético, o qual reduz a termogênese via UCP-1 (*uncoupling proteins*) no tecido adiposo marrom e no metabolismo de adipócitos (120).

Um fato importante a ser realçado aqui é que nem todas as repostas induzidas pelo peptídeo Ang-[3-8] são efetuadas através da ativação do receptor AT₄, algumas delas podem ser mediadas pelo receptor AT₁. Um exemplo desse tipo de resposta é o aumento da pressão arterial e vasoconstrição renal mediadas pelo receptor AT₁ após infusão de Ang-[3-8] (121). Assim, pouco

se sabe da importância desse receptor na regulação cardiovascular e mais estudos são necessários para melhor compreensão.

Receptor Mas: Após a utilização de antagonistas seletivos das ações da Ang-[1-7], D-[Ala7]-Ang-[1-7] - (A-779), estudos demonstraram que esse peptídeo se ligava a diferentes receptores existentes na via clássica da angiotensina (AT₁ e AT₂). Assim identificaram um receptor que pertence a família dos receptores acoplados à proteína G e que é funcional para Ang-[1-7], ou seja, o receptor Mas (59). Esse receptor teve sua expressão identificada em neurônios de de regiões cerebrais como hipocampo, amígdala, córtex e áreas com importância no controle cardiovascular como NTS, núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), rostró ventrolateral do bulbo (RVLM) e ventrolateral caudal do bulbo (CVLM) (122). Além do cérebro, o rim apresentou alta expressão do receptor Mas, sendo encontrado principalmente nos vasos renais e nos túbulos proximais (123).

O eixo ECA2/Ang-[1-7]/Mas tem sido sugerido como uma via importante no SRA com efeitos contra regulatórios da ECA/Ang-[1-8]/AT₁. Após infusão de Ang-[1-7] intravenosa houve aumento do fluxo sanguíneo renal, mesentérico e cerebral, assim como houve aumento do índice cardíaco e diminuição da resistência total periférica. Entretanto nessa dose utilizada não houve alterações na pressão arterial e frequência cardíaca (124). Outros estudos demonstram que Ang-[1-7] através do receptor Mas possui efeito antiproliferativo, reduzindo o crescimento de cardiomiócitos após infarto do miocárdio (125) e antitrombótico (126). Apesar de muitos estudos serem publicados ultimamente sobre os efeitos da Ang-[1-7], pouco se sabe sobre o real efeito do receptor Mas e se todos os efeitos da Ang-[1-7] são realmente sempre mediados pelo receptor Mas e não através de outros possíveis receptores como AT₂ ou até mesmo AT₁. Esse tipo de argumento é levado em consideração principalmente quando se refere ao cérebro. A Ang-[1-7] pode induzir uma resposta similar à da Ang-[1-8] na regulação da PAM quando injetada na RVLM, CVLM e NTS (38). Outro caso a se pensar sobre a especificidade da Ang-[1-7] ao receptor Mas foi após cortes histológicos de rim tratados com ¹²⁵I-Ang-[1-7] não houve muita diferença entre camundongos *Mas-knockout* (KO) e selvagem, e mesmo alterando a concentração do ligante radioativo, a marcação foi praticamente ausente (123). Mais questionamentos surgiram quando ratos tratados com PD123319, antagonista do receptor AT₂, não apresentaram respostas vasodepressora após infusão de Ang-[1-7] (127). Muitos estudos estão sendo feitos para avaliar tanto a função do peptídeo Ang-[1-7] quanto a função do receptor Mas, porém ainda existem questões a serem respondidas quando se refere a especificidade da resposta.

Hipótese

Sabendo dos efeitos da restrição alimentar sobre o funcionamento cardiovascular e sua influencia sobre a pressão arterial e sistema nervoso simpático, além de estar bem estabelecido que o sistema renina angiotensina está relacionado com controle de pressão arterial e SNS, o intuito desse trabalho foi investigar os efeitos da restrição alimentar no sistema renina angiotensina periférico determinando os locais de alteração e seus efeitos na regulação da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da restrição alimentar no sistema renina-angiotensina em ratas Fischer

2.2 Objetivos específicos:

- Determinar o efeito da restrição alimentar no volume sanguíneo, peso corporal, concentração plasmática de sódio e potássio, pressão arterial e frequência cardíaca basal;
- Determinar o efeito da restrição alimentar na responsividade do sistema renina angiotensina periférico;
- Determinar o efeito da restrição alimentar na concentração plasmática dos peptídeos do sistema renina angiotensina;
- Determinar o efeito da restrição alimentar na atividade plasmática da ECA, ECA2 e renina;
- Determinar o efeito da restrição alimentar nos receptores angiotensinérgicos em vasos de resistência.

3. Material e métodos

Para realização deste trabalho, foram utilizadas ratas Fisher com aproximadamente 4 meses de idade, pesando entre 200-220g. Os animais foram cedidos pelo Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto – CCA - Brasil ou comprados na Harlam® - EUA.

Antes de iniciar os experimentos, os animais ficaram três dias no biotério de experimentação para ambientalização e passado esse período os animais foram alojados em caixas individuais de 30x19x13cm durante todo o período de tratamento dietético. Os animais foram mantidos em uma temperatura média de $23 \pm 1^\circ\text{C}$, com um ciclo claro-escuro de doze horas e todos os animais receberam água *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com aprovação prévia do Comitê de Ética de uso de animais da Universidade Federal de Ouro Preto, CEUA_UFOP (Protocolo nº 2016/02) e pelo comitê de ética da Universidade de Georgetown (Protocolo nº. 16:1234). Os experimentos foram realizados sempre seguindo as normas da Lei Arouca (Lei 11.794) e o Guia de Uso e Cuidados de Animais de Laboratório do *National Research Council, EUA*.

3.1 Modelo experimental animal - Restrição alimentar

O modelo de restrição alimentar utilizado foi de 60% por 14 dias. Primeiramente a ingestão alimentar de cada rato foi quantificada por duas semanas. Após a determinação do consumo médio diário, o grupo experimental passou a receber diariamente 60% a menos e o grupo controle permaneceu recebendo ração *ad libitum*. A ração utilizada foi a ração comercial Nuvilab® e a redução da oferta de ração consistiu na redução de calorias, de macro e micronutriente e esse protocolo foi seguido por 14 dias. Todos os animais foram pesados diariamente antes de receberem a ração e a ração foi oferecida todos os dias uma hora antes de iniciar o ciclo escuro.

3.2 Fármacos e soluções

Ang-[1-10]: Sigma, St. Louis, MO, EUA - iv: 154 nmol/L; dose: 0,1mL/100g de animal;

Ang-[1-8]: Sigma, St. Louis, MO, EUA - iv: 191 nmol/L; dose: 0,1mL/100g de animal;

Ang-[1-7]: Sigma, St. Louis, MO, EUA - iv: 191 nmol/L, dose: 0,1mL/100g de animal;

Azul de Evans: Sigma, St. Louis, MO, EUA – iv: 0.3 mg/ml; 0,2mL

Captopril: Sigma, St. Louis, MO, EUA – iv: 9.2 mmol/L; 0,2mL

L-fenilefrina: Sigma, St. Louis, MO, EUA – iv: 50µg/mL; Velocidade de infusão de 2,2mL/h com volume infundido de 0,1mL. A seringa utilizada foi de vidro com o tamanho de 57mm.

Heparina: 125UL em 25mL. A quantidade utilizada de heparina foi o suficiente para preenchimento das cânulas arteriais.

Inactin: Sigma, St. Louis, MO, EUA - 100mg/mL Dose:0.1mL/100mg de peso corporal

Isoflurano: Cristália Ltda, Itapira, SP, Brasil - Administrado por via aérea na dose de 2 – 2,5% em 2L de oxigênio (O₂) por minuto.

Ketoflex 1% p/v (Cetoprofeno): Mundo Animal, Pindamonhangaba, SP, Brasil - Dose: 0,03mL/300g de peso corporal no volume de 0,1mL/300g de animal, via i.m.

Losartan: Sigma, St. Louis, MO, EUA - i.v. dose de 10mg/Kg de peso no volume de 0,1mL/100g de peso, i.c.v. (ventrículo lateral) utilizou-se a dose 10µg por animal no volume de 2µL.

MLN406 - EMD Millipore, Billerica, MA, USA - 20 µmol/L

Pentabiótico Veterinário: Fort Dodge Animal Health, Hialeah, FL, USA - Dose: 4.800UI de penicilina, 2mg de estreptomina e 2mg de diidroestreptomina por kg de peso. O volume injetado foi 0,1 mL/100g de animal por via i.m.

Substrato: Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)-Pro-OH - GenScript (Piscataway, NJ, USA)

Mca-Ala-Pro-Lys(Dnp)-OH - Enzo Life Science (Farmingdale, NY, USA)

3.3 Confecção dos materiais utilizados

Confecção das cânulas arteriais e venosas

As cânulas arteriais e venosas foram confeccionadas a partir da junção por aquecimento de um tubo de polietileno (PE) 50 mm a outro tubo de PE de 10 mm de circunferência. As medidas utilizadas foram as seguintes: cânula arterial – 13,0cm de PE 50 mm soldado em 3,0 cm de PE 10 mm. Cânula venosa – 13,0 cm de PE 50 mm soldado em 2,0 cm de PE10 mm.

3.4 Cirurgias e procedimentos para análise cardiovascular

Implante das cânulas arterial e venosa

No 14^o dia, os animais foram submetidos aos procedimentos pré-cirúrgicos (sedação e anestesia) para o implante das cânulas na artéria e veia femoral utilizando o anestésico inalatório (Isoflurano 2 – 2,5% - 2 L/min de O₂). A região inguinal e do dorso foram tricotomizadas seguido de assepsia com polivinil pirrolidona iodo degermante. Através de uma pequena incisão na região inguinal, o trígono femoral foi exposto, os vasos femorais identificados e separados do nervo femoral. Um cateter de polietileno foi introduzido na artéria femoral até alcançar a aorta abdominal. No caso de experimentos com infusões de drogas i.v., outro cateter de polietileno foi inserido na veia femoral (Figura 3). Após a introdução dos cateteres, estes foram passados pelo tecido subcutâneo do animal, com o auxílio de um pequeno tubo de metal (trocáter), até a sua exteriorização na região interescapular. Para garantir a não oclusão do cateter por formação de trombo, o mesmo foi preenchido com solução de salina heparinizada e a ponta do cateter exposta no dorso foi obstruída com um pino de aço inoxidável. Terminado o procedimento, os locais de incisão foram suturados e os animais tiveram um período de recuperação de 48Hs (128).

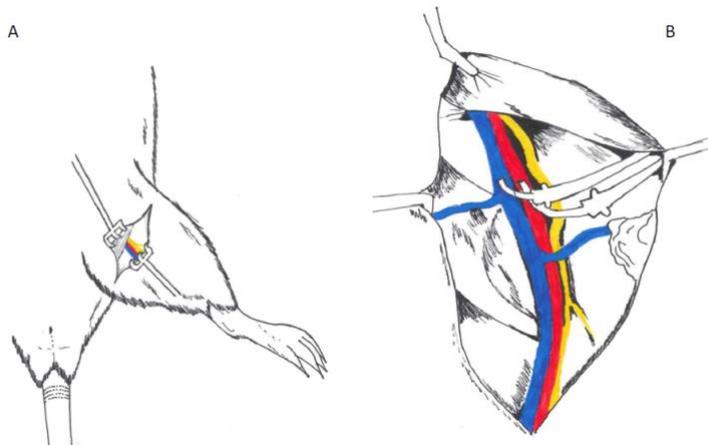


Figura 3: Esquema simplificado da canulação da artéria (vermelho) e da veia (azul) femoral (128)

3.5 Cuidados pós-operatórios

Após as cirurgias, todos os animais receberam injeção sub cutânea (s.c.) de cetoprofeno e uma dose profilática de penicilina, para prevenção de inflamações e infecções, e posteriormente foram alocados em gaiolas individuais. Após passar o efeito do anestésico, os animais foram mantidos na sala de experimentos sob condições de temperatura, luminosidade e níveis de ruído controlados, com dieta de acordo com o protocolo previamente estabelecido e água *ad libitum*.

3.6 Registros e análises da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC)

Para registro dos parâmetros cardiovasculares, a cânula inserida na artéria femoral foi conectada a um transdutor, que ligado a um sistema de aquisição de dados Power Lab 4/20 (ADInstruments) possibilitou o registro da pressão arterial pulsátil (PAP). As oscilações de pressão captadas foram amplificadas e convertidas em sinais enviados a uma placa de aquisição de dados, através de uma placa de conversão analógico/digital. O software de leitura Chart 7 for Windows realizou a coleta contínua da PAP, calculando a partir desta, os valores de FC e PAM.

3.7 Procedimento para infusão de drogas

Para a infusão endovenosa, uma seringa de 1 mL foi conectada na parte externa do cateter que foi inserido na veia femoral e aproximadamente 0,2 mL das respectivas drogas foi injetado em bolus. Após injetar a droga, a seringa foi retirada e uma outra seringa contendo PBS (tampão fosfato-salino) foi conectada ao cateter com a intenção de empurrar a droga residual com o PBS.

Desenho experimental para infusão de drogas

No dia do experimento os animais foram colocados na sala de experimentação, em suas

caixas, 2h antes de iniciar o registro. Os animais foram conectados ao sistema de registro e apenas após a PAM e FC demonstrarem estar estáveis, foi iniciado o protocolo experimental. Foi considerado como período basal quando a PAM e FC mantiveram-se constantes por no mínimo 10 min e isso foi seguido independente da droga administrada.

Ang-[1-10]: No primeiro dia de registro foi administrado captopril, esperou-se 10 min e logo em seguida foi administrado Ang-[1-10], a qual teve sua resposta registrada por 40 min. No segundo dia foi injetado veículo e Ang-[1-10] em seguida. Captopril e veículo foram administrados em dias alternados de maneira randômica.

Ang-[1-8]: No primeiro dia de registro foi administrado Ang-[1-8] e resposta foi registrada por 30min. No segundo dia o veículo foi administrado e o registro seguiu-se por 30 min novamente. Veículo e Ang-[1-8] foram administrados em dias alternados de maneira randômica.

Ang-[1-7]: No primeiro dia de registro foi administrado Ang-[1-7] e a resposta foi registrada por 40min. No segundo dia o veículo foi administrado e o registro seguiu-se por 40 min novamente. Veículo e Ang-[1-7] foram administrados em dias alternados de maneira randômica.

Losartan: No primeiro dia de registro foi administrado Losartan e resposta foi registrada por 40min. No segundo dia o veículo foi administrado e o registro seguiu-se por 40 min novamente. Veículo e Losartan foram administrados em dias alternados de maneira randômica.

Análise dos registros

Os valores de PAM e FC foram registrados continuamente. Os valores basais para PAM e FC foram obtidos calculando-se a média dos 2min de registro anteriores a infusão de drogas. A partir da infusão continuou-se calculando a média de cada parâmetro a cada 2min até o final do registro para posterior cálculo do gráfico em forma de curva. A variação da PAM e FC foram calculadas subtraindo o valor basal da máxima/mínima reposita obtida após a injeção de drogas/veículo para o cálculo do gráfico em barra. Como os valores basais diferem por causa do tratamento dietético, todos os valores foram normalizados pelo valor basal de cada animal, ou seja, os gráficos foram expressos como alterações causadas pela droga em relação ao basal.

3.8 Caracterização dos efeitos da restrição alimentar no perfil hemodinâmico

Determinação da concentração plasmática de sódio e potássio

Para avaliar o efeito da restrição alimentar no perfil hemodinâmico, foram utilizadas ratas sem cirurgia prévia. Os animais foram anestesiados com isoflurano e o sangue foi coletado através de punção cardíaca. Todas as amostras foram centrifugadas a 13.000g por 10min para separação do plasma e posterior congelamento no freezer -80C. As amostras de plasma foram diluídas 200x em uma solução padrão para leitura no fotômetro de chamas (Cole-Parmer_model 2655-10) para determinação da concentração plasmática de sódio e potássio.

Determinação do volume plasmático - Azul de Evans

O volume plasmático foi determinado através da técnica de azul de Evans. Seguido uma coleta prévia de sangue para utilização futura como leitura basal, infundiu-se através de um cateter posicionado dentro da veia femoral o corante azul de Evans (0,3 mg/ml). Após 5 e 10 min da infusão do corante, uma amostra de sangue foi retirada com volume aproximado de 0,2 mL e posteriormente essas amostras foram centrifugadas para separação do plasma. A curva padrão foi feita utilizando 1% de plasma como solvente do corante nas seguintes concentrações 0, 1, 5, 10, e 20 g/ml. Uma amostra de 100 µL de plasma foi adicionada no leitor de placa com excitação de 610 nm para determinar a concentração do corante nos tempos de coleta 5 min e 10 min, assim como para determinar o *background* de cada amostra utilizando o plasma coletado antes da injeção de corante. A correção do *background* foi feita subtraindo o valor obtido para a amostra basal dos valores observados em cada tempo de coleta. O volume plasmático foi então calculado dividindo a quantidade de corante injetada pela quantidade em cada amostra corrigida pelo *background*. O volume total de plasma foi então estimado através do cálculo da média de diluição obtida entre o tempo 5 e 10 min (129).

3.9 Determinação da concentração dos peptídeos do SRA

RAS-FINGERPRINT®

Após os animais serem anestesiados com Inactin, o sangue foi coletado através da punção cardíaca com auxílio de uma seringa contendo heparina e inibidor de protease específico para enzimas do sistema renina angiotensina enviado pela empresa Attoquant Diagnostics, Viena-Austria. Em um segundo grupo, após serem anestesiados, os animais receberam uma infusão endovenosa de Ang-[1-10] e o sangue foi coletado após 10min. As amostras foram centrifugadas (2000g, 4°C, 10min), o plasma coletado e armazenado no freezer -80C. O metabolismo dos peptídeos foi realizado como descrito por Sharp, 2015 (130). A quantificação dos peptídeos foi realizada por cromatografia líquida e espectroscopia de massa em tandem (LC-MS/MS).

As amostras de sangue foram coletadas usando o *cocktail* de inibidor de proteases que bloqueia todo o metabolismo da via da angiotensina como metaloproteases (ácido etilenediaminetetraacético, 1,10-fenantrolina), aspártico proteases (pepstatina A), cisteína proteases (p-ácido hidroximercuribenzoico), serina proteases (AEBSF) e inibidores específicos para renina e aminopeptidase A e N com a concentração final de 5% v/v (Attoquant Diagnostics, Vienna, Austria). As amostras foram estabilizadas e misturadas com isótopo-marcado para cada padrão respectivo aos peptídeos Ang-[1-10], Ang-[2-8], Ang-[1-7], Ang-[1-5], Ang-[2-8], Ang-[3-8], Ang-[2-10], Ang-[2-7], Ang-[1-9] e Ang-[3-7] na concentração de 200 pg/ml. Seguindo a extração de fase sólida baseada no C18, as amostras foram submetidas a análise de LC-MS/MS usando uma coluna analítica de fase reversa (Acquity UPLC® C18, Waters) operando em linha com um XEVO TQ-S espectrômetro de massa triplo quadrupolo (Waters) no modo MRM. Os padrões internos foram usados para corrigir a recuperação dos peptídeos da preparação da amostra para cada amostra e para cada peptídeo. As concentrações dos peptídeos foram calculadas considerando os fatores de resposta correspondente na curva de calibração apropriada na amostra original, em condições que os sinais excederam a razão sinal-ruído de 10.

Angiotensinogênio

Para quantificação do AGT sanguíneo foi realizado um imunoenensaio enzimático, Elisa. Primeiramente o soro foi diluído 2500x e posteriormente foram seguidas as recomendações do fabricante do kit (IBL, Hamburg, Alemanha).

3.10 Determinação das atividades enzimáticas da ECA, ECA2 e Renina

ECA

Foi utilizado o substrato fluorogênico Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)-Pro-OH (GenScript, USA). Em cada poço de uma placa de 96 poços foi adicionado 80µL do tampão de reação (1 M NaCl, 0.5 mM ZnCl₂, 75 mM Tris, pH 7.5) na presença de veículo ou ECA inibidor. Atividade enzimática total foi medida na presença de veículo (tampão). Atividade não específica à ECA foi definida como a atividade medida na presença de 20µM de captopril - Inibidor da ECA (Sigma Chemical Co, MO, USA). Atividade específica da ECA foi definida como atividade da ECA menos atividade não específica. Para reação foi adicionado em cada poço 10µL de plasma diluído 10x, 10µL do substrato fluorogênico para atingir a concentração final de 60µM. A formação do produto foi determinada a 37°C pela leitura da fluorescência em função do tempo usando um leitor de placa (FLUOstar Omega, BMG LABTECH Inc, NC, USA) com onda de excitação de 320nm e emissão de 410nm. A velocidade inicial foi determinada utilizando a parte linear da reação (10-60min) e calculada a partir da razão de aumento da fluorescência em função do tempo. Protocolo adaptado (131).

ECA2

Foi utilizado o substrato fluorogênico Mca-Ala-Pro-Lys(Dnp)-OH (Enzo Life Science, USA). Foi adicionado em cada poço de uma placa de 96 poços 85µL do tampão de reação (1 M NaCl, 0.5 mM ZnCl₂, 75 mM Tris, pH 7.5) na presença de veículo ou do inibidor da ECA (captopril) ou ECA2 (MLN-4760). Atividade enzimática total foi medida na presença do tampão. Atividade não específica da ECA foi definida na presença de 20µM captopril (Sigma Chemical Co, MO, USA). Atividade de peptidase não específica foi definida na presença de 20µM de captopril e 20µM de MLN-4760 (EMD Millipore, USA). A atividade específica da ECA2 foi definida como atividade não específica da ECA menos atividade não específica de peptidases. Imediatamente

após adicionar 10µL do substrato, 5µL do plasma foi adicionado em cada poço para atingir a concentração final do substrato de 30µM. A formação do produto foi determinada à 37°C pela leitura da intensidade de fluorescência em função do tempo. A leitura foi feita no leitor de placas (FLUOstar Omega, BMG LABTECH Inc, NC, USA) com a onda de excitação de 320nm e emissão de 410nm. A velocidade inicial foi determinada utilizando a parte linear da reação (10-60min) e calculada a partir da razão de aumento da fluorescência em função do tempo (132).

Para otimização do ensaio foi calculada a cinética enzimática utilizando o programa Prism 7.0 (GraphPad Software Inc, CA, USA) para geração dos valores de V_{max} e K_m a partir da equação de Michaelis-Menten: $V = V_{max}[S]/([S] + K_m)$, onde V = velocidade; V_{max} = velocidade máxima; $[S]$ = concentração do substrato; K_m = constante de Michaelis-Menten (dados não apresentados).

Renina

A atividade plasmática da renina foi determinada através da técnica de fluorescência usando FRET e segundo as recomendações do fabricante do kit SensoLyte 520 Rat Renin Fluorimetric Assay (AnaSpec, San Jose-CA). A análise foi realizada utilizando-se 40 µL de plasma incubado por 3h à 37°C com leituras feitas no leitor de placas (FLUOstar Omega, BMG LABTECH Inc, NC, USA) com a onda de excitação de 490 nm e emissão de 520 nm a cada 2 min por 3h (133).

3.11 Determinação dos receptores de angiotensina

qPCR

O leito mesentérico, incluindo artérias e veias, foram removidos da parede intestinal. O leito mesentérico, incluindo a artéria mesentérica anterior, foi posicionado em uma placa de petri contendo solução salina gelada. O tecido adiposo foi cuidadosamente removido dos vasos e posteriormente as veias foram removidas com o auxílio de um microscópio para dissecação (Olympus). As artérias mesentéricas foram rapidamente isolada e congeladas (134). Posteriormente os tecidos isolados foram homogeneizados em tubos de 2mL contendo microesferas de cerâmica (MP biomedical). O procedimento para isolar o RNA foi de acordo as instruções do fabricante do kit RNeasy (Quiagen). Após isolar o RNA, 1µg de RNA foi utilizado na

reação de transcrição reversa utilizando o kit de cDNA de alta capacidade de transcrição reversa (Bio-Rad). Quantificação do RNAm foi feito através da reação de PCR em tempo real utilizando o sistema de detecção de sequência ABI Prism 7700.

(Applied Biosystems, Foster City, CA). Os reagentes utilizados na reação PCR consistiram na utilização de água RNase-free, SYBR green supermix (Bio-Rad) e 300nM do primer a seguir: **AT_{1A}R** - F: 5'-CTC AAG CCT GTC TAC GAA AAT GAG-3'; R: 5'-TAG ATC CTG AGG CAG GGT GAA T-3'. **AT₂R** - F: 5'-ACC TTT TGA ACA TGG TGC TTT G-3'; R: 5'-GTT TCT CTG GGT CTG TTT GCT C-3'. **Mas** - F: 5'-CACTGGCCCTCCTGATGAA - 3'; R 5'-GGATGCCAGAATTGAACACAGA-3'; **B-actin** - F: 5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3', R – 5'-TTTAATGTCACGCACGATTTTC-3'. A quantidade de cDNA utilizada foi calculada baseada em curvas padrões testadas anteriormente e a eficiência dos primers utilizados foram entre 90-101%.

3.12 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Prism 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (SEM). Todos os resultados foram analisados para o teste de normalidade através do teste Shapiro-Wilk e para os dados que seguirem uma distribuição normal, foi utilizado o teste *t* de *Student* para dados não pareados. Análise de variância Anova *two way* com post teste de Bonferroni foi utilizado quando os dados analisados apresentavam 2 variáveis. O nível de significância utilizado foi $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Parâmetros fisiológicos e hemodinâmicos

Após 14 dias de restrição alimentar houve redução do peso corporal em 17% (Tabela 1). Assim como o peso corporal, a RA também reduziu a PAM, FC, volume plasmático e concentração plasmática de potássio. Entretanto, a RA aumentou no hematócrito e não alterou a concentração de sódio plasmático.

Tabela 1: Efeito da restrição alimentar sobre os parâmetros hemodinâmicos e fisiológicos

	Controle	Restrição	P value
	Média ± SEM; N	Média ± SEM; N	
Ganho de peso corporal (g)	5,1 ± 1,1; n=58	-33,9 ± 2,1; n=59	<0,0001*
PAM (mmHg)	113,1 ± 1,9; n=33	107,5 ± 1,6; n=32	0,0302*
FC (bpm)	380,4 ± 5,8; n=33	357,2 ± 8,9; n=32	0,0318*
Volume plasmático (mL)	8,9 ± 1,0; n=8	6,1 ± 0,7; n=8	0,0323*
Volume plasmático/ peso corporal (mL/100g)	4,6 ± 0,5; n=8	4,1 ± 0,4; n=8	0,4733
Hematócrito (%)	45,3 ± 0,2; n=7	48,2 ± 0,7; n=6	0,0013*
Na⁺ plasma (mmol/L)	135,4 ± 2,8; n=8	140,4 ± 1,8; n=8	0,1584
K⁺ plasma (mmol/L)	5,3 ± 0,3; n=8	4,6 ± 0,1; n=8	0,0296*

Caracterização fisiológica e hemodinâmica de ratas submetidas à restrição alimentar de 60% por 14 dias. Test t de *Student* não pareado (*p<0,05 vs. controle).

4.2 Efeito da RA sobre a responsividade à Ang-[1-10]

Primeiramente os ratos receberam uma infusão de veículo ou captopril 10 minutos antes da infusão de Ang-[1-10]. Na presença de veículo, Ang-[1-10] causou uma maior resposta pressora nos animais com RA (p=0,03) tanto na resposta no decorrer do tempo quanto na resposta máxima (p<0,001). Entretanto quando a infusão prévia foi o captopril, a Ang-[1-10] não elevou a pressão arterial como foi observado anteriormente (Figura 4A e C). Quando se observa os efeitos na FC, a Ang-[1-10] quando infundida após o veículo gerou uma maior bradicardia no grupo submetido à restrição alimentar (p<0,05). Porém quando a Ang-[1-10] foi infundida após o

bloqueio da ECA, não houve alterações significativas em comparação ao controle (Figura 4B e D).

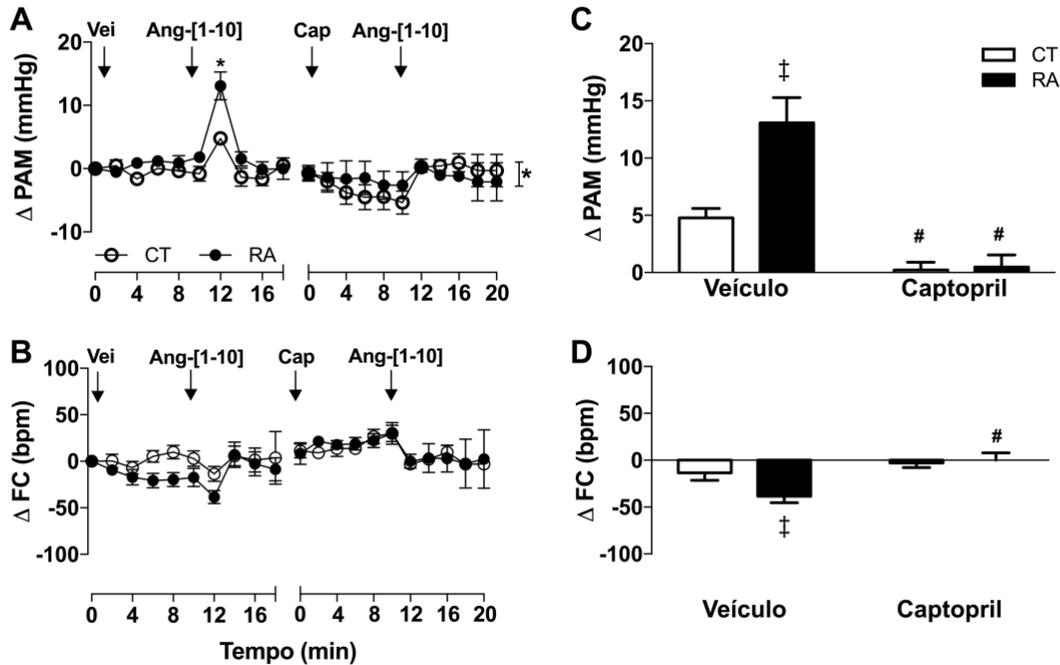


Figura 4: Efeito da restrição alimentar nos efeitos da Ang-[1-10] sobre a PAM e FC. Comparação da variação da PAM (A) e FC (B) no decorrer do tempo e comparação da alteração máxima obtida para a PAM (C) e FC (D) após infusão iv de Ang-[1-10] em relação aos valores basais anteriores ao veículo (Vei) e captopril (Cap) em ratos controle (CT) e submetidas à restrição alimentar (RA) (n=7/grupo). *P<0,05 vs. CT através do teste de ANOVA two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni (tempo; dieta). #P<0,001 vs. veículo, mesmo grupo através da análise não pareada e teste t de Student e ‡p<0,002 vs. CT, mesmo tratamento, através do teste de variância ANOVA two way, seguido do pós teste de Bonferroni.

4.3 Efeito da RA sobre a responsividade à Ang-[1-8]

Após a infusão de veículo não houve alterações significativas na PAM (Figura 5C) e FC (Figura 5D) em ambos os grupos. Porém, quando a Ang-[1-8] foi injetada, houve uma resposta pressora menor nos animais com RA, por volta de 17mmHg a menos que a resposta obtida no grupo CT (p<0,0001). Quando se compara o efeito da Ang-[1-8] no decorrer do tempo, a resposta pressora também foi menor (p<0,0001) (Figura 5A), sem causar efeitos significativos na FC

(Figura 5B). Da mesma forma, a infusão de Ang-[1-8] diminuiu a FC nos ratos CT, porém não alterou nos ratos RA (Figura 5D).

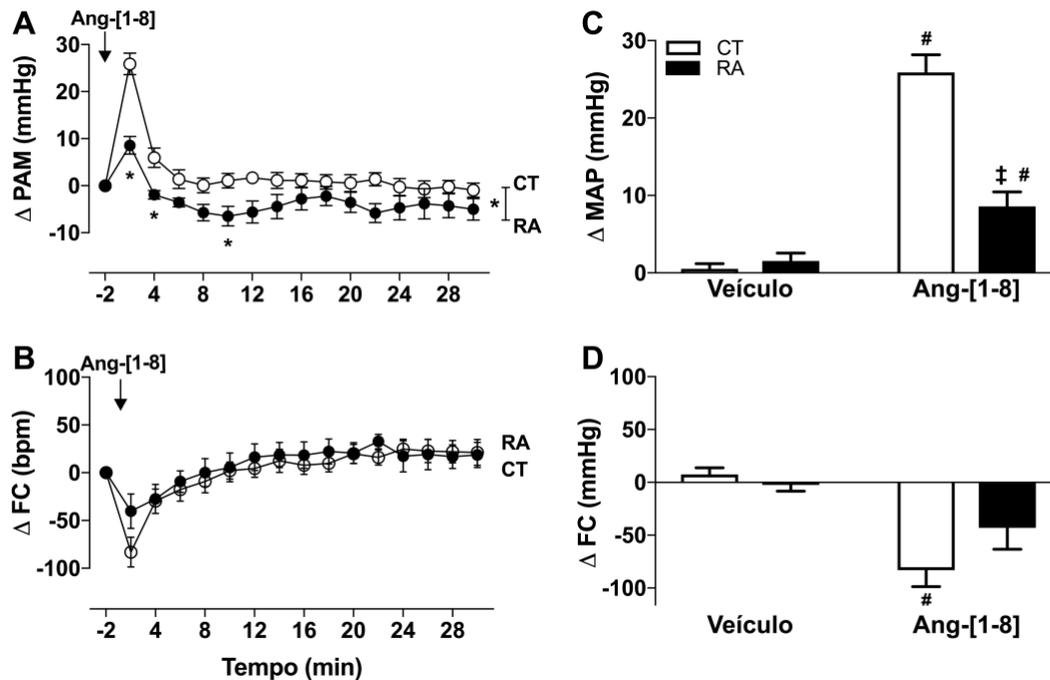


Figura 5: Efeito da restrição alimentar nos efeitos da Ang-[1-8] sobre a PAM e FC. Comparação da variação da PAM (A) e FC (B) no decorrer do tempo e comparação da alteração máxima obtida para a PAM (C) e FC (D) após infusão iv de Ang-[1-8] em relação aos valores basais em ratos controle (CT) submetidas à restrição alimentar (RA) (n=8/grupo). *P<0,0001 vs. CT através do teste de ANOVA two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni (tempo; dieta). #P<0,01 vs. veículo, mesmo grupo através da análise não pareada e teste t de Student e †p<0,0001 vs. CT, mesmo tratamento, através do teste de variância ANOVA two way, seguido do pos teste de Bonferroni.

4.4 Efeito da RA sobre a responsividade à Ang-[1-7]

Após a análise dos efeitos da Ang-[1-7] sobre a PAM no decorrer do tempo, observa-se uma resposta pressora significativa no grupo RA ($p<0,001$) (Figura 6A) e o mesmo ocorreu na FC ($p<0,05$) (Figura 6B). Entretanto quando a comparação foi pontual, analisando a resposta máxima de cada parâmetro, não houve diferença tanto para PAM quanto para FC (Figura 6C e D).

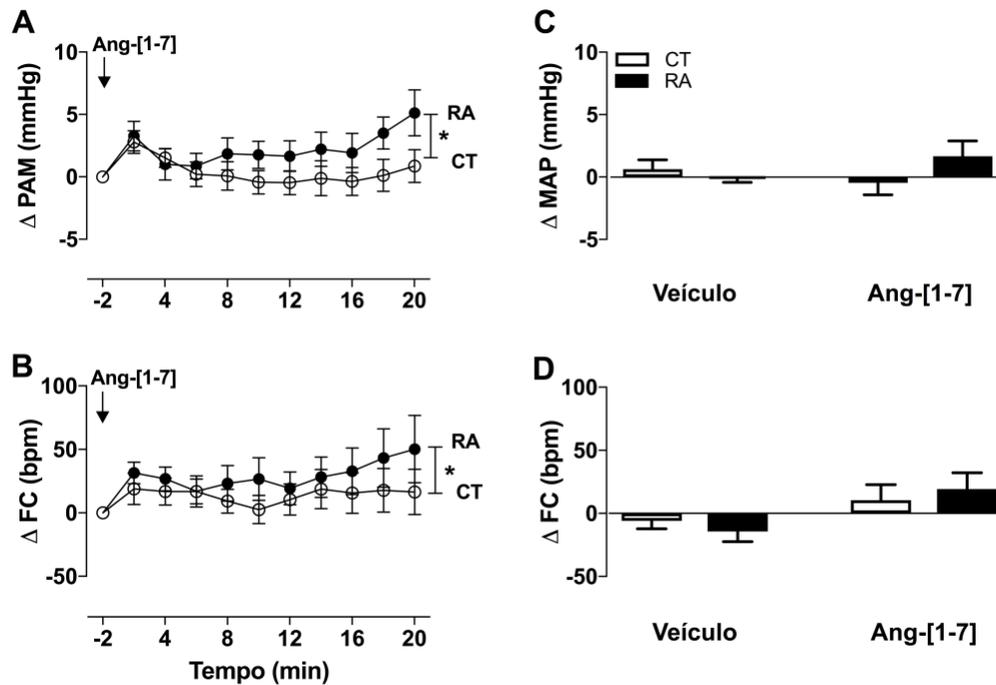


Figura 6: Efeito da restrição alimentar nos efeitos da Ang-[1-7] sobre a PAM e FC. Comparação da variação da PAM (A) e FC (B) no decorrer do tempo e comparação da alteração máxima obtida para a PAM (C) e FC (D) após infusão iv de Ang-[1-7] em relação aos valores basais em ratos controle (CT) e submetidas à restrição alimentar (RA) (n=9-10/grupo). *P<0,05 vs. CT através do teste de ANOVA two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni (tempo; dieta).

4.5 Efeito da RA na atividade plasmática da ECA, ECA2 e Renina

A quantidade de produto formado pela renina (Figura 7A) não foi diferente entre os grupos CT e RA (p=0,9242). Entretanto, a formação do produto pela ECA (Figura 7C) plasmática foi maior no grupo RA quando comparada com animais CT (P<0,0001), assim como a velocidade também foi mais rápida (Figure 7B) (P<0,001) na RA. Na análise da formação do produto produzido pela ECA2 (p<0,0001) (Figura 7E) e a velocidade (Figure 7D) (P<0,0001) de formação também foram maiores e mais rápidos nos animais RA comparados com CT. De forma paralela, após a quantificação da concentração dos peptídeos plasmáticos, analisando a razão de formação dos principais peptídeos, pode-se observar que a quantidade de formação de Ang-[1-10] em relação ao AGT foi a mesma em ambos grupos (p=0,3631) (Figura 7F), assim como a relação Ang-[1-8]/AGT (p=0,4750) (Figura 7G). Entretanto a razão de formação da Ang-[1-8] sobre a Ang-[1-10] foi maior no grupo RA comparado com CT (p=0,0330) (Figura H).

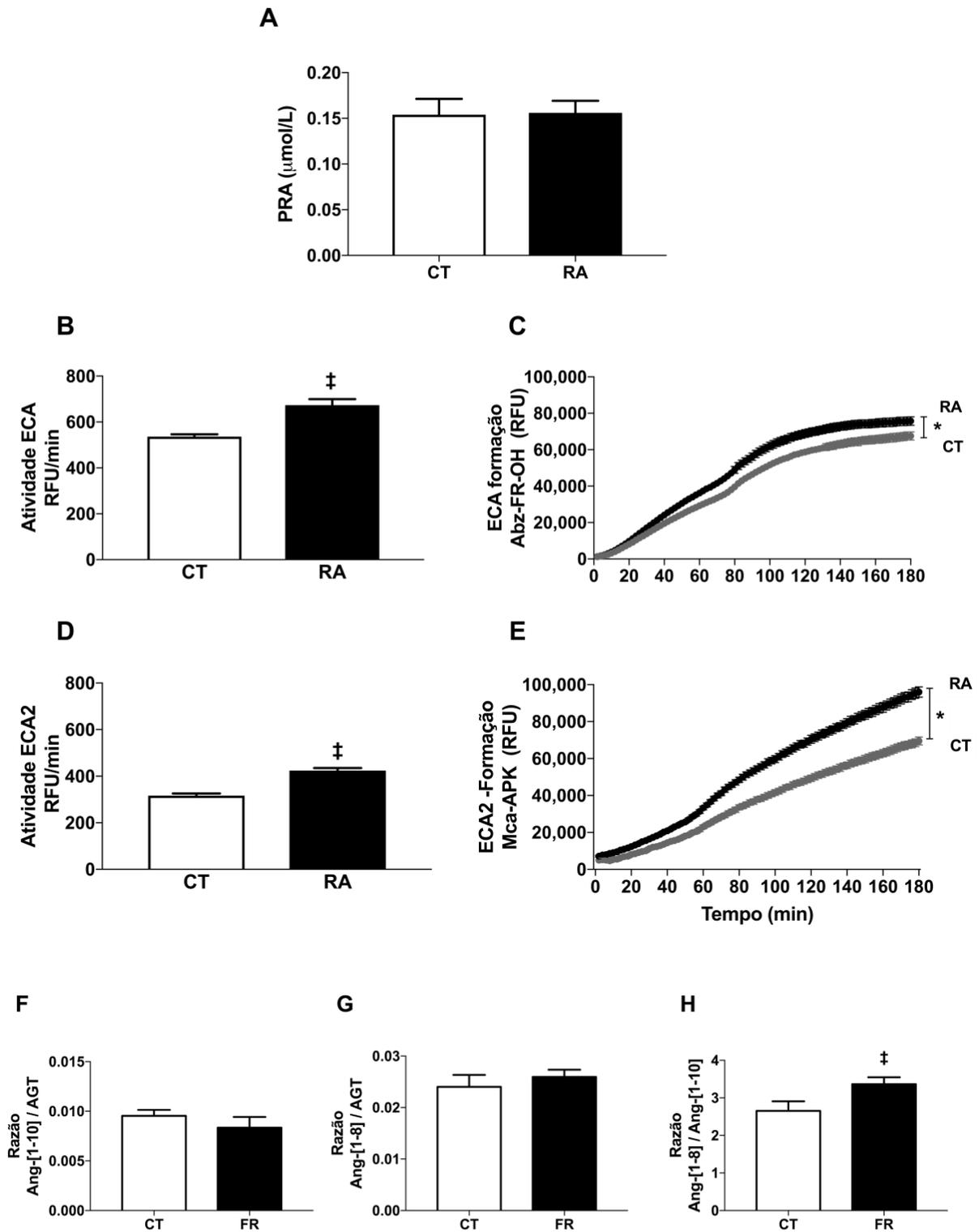
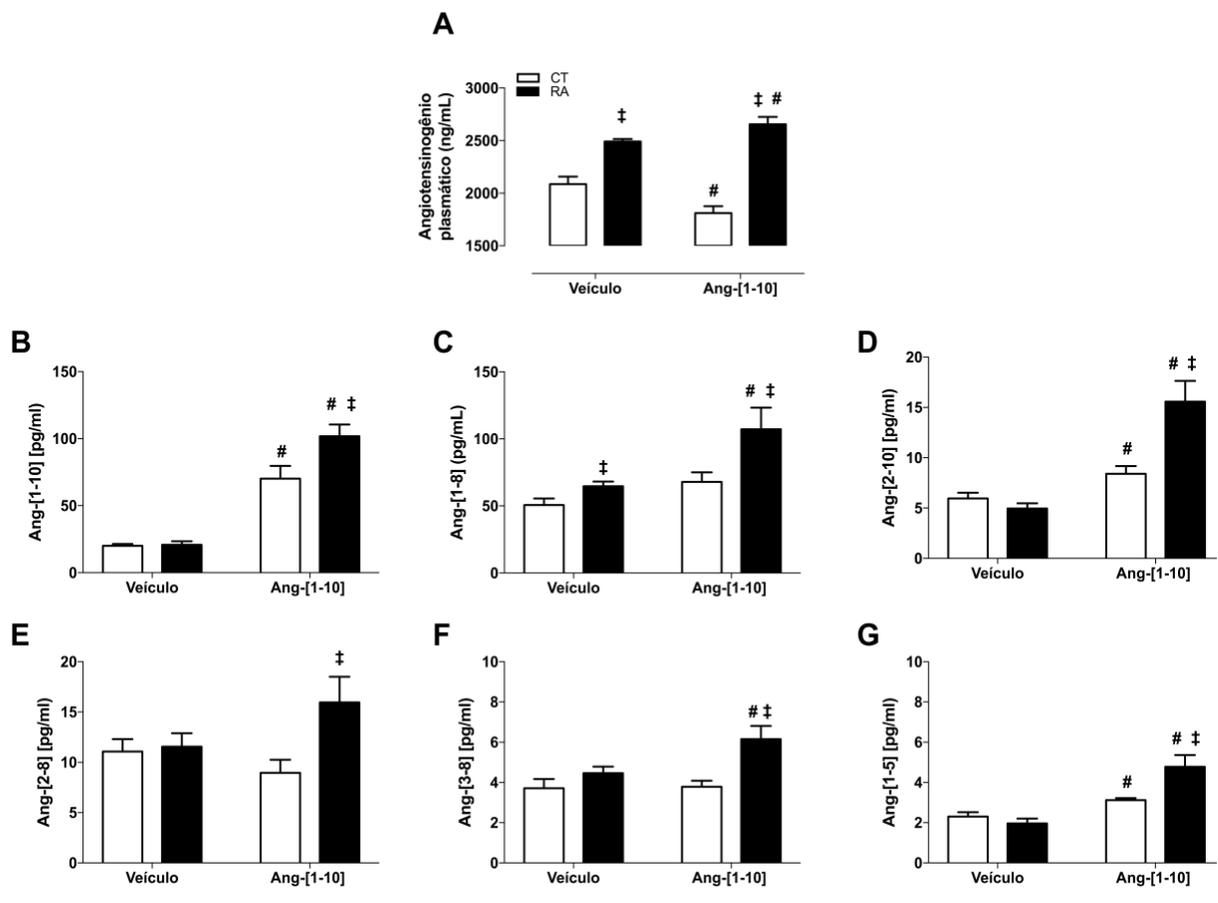


Figura 7: Efeito da restrição alimentar na atividade da renina, ECA e ECA2 em amostras de plasma. Comparação da atividade plasmática da renina ($p=0,9242$) (A) ($n=10-7/\text{grupo}$), velocidade da formação de

substrato da ECA **(B)** (n=8/grupo) e ECA2 **(D)** (n=8/grupo) e curva representativa da formação de substrato no decorrer do tempo da ECA **(C)** e ECA2 **(E)** em ratas controle (CT) e submetidas à restrição alimentar (RA). Razão da formação da Ang-[1-10] para AGT (p=0,3631) **(F)**, Ang-[1-8] para AGT (p=0,4750) **(G)** e Ang-[1-8] para Ang-[1-10] (p=0,0330) **(H)**. *P<0,001 vs. CT através do teste de ANOVA two-way seguido do teste de Bonferroni (tempo; dieta); †P<0,05 vs. CT, mesmo tratamento através do teste t de *Student*. PRA: *plasma renin activity*; atividade plasmática da renina.

4.6 Efeito da RA na concentração plasmática dos peptídeos de angiotensina e angiotensinogênio

Quando se compara os níveis basais de AGT plasmático, os animais do grupo RA apresentaram um aumento na quantidade dessa proteína circulante quando comparado com o CT (p=0,0001). Após a infusão iv de Ang-[1-10] essa concentração aumentada na RA em relação ao controle permaneceu (p<0,0001), entretanto quando se compara a resposta obtida no mesmo grupo, a infusão de Ang-[1-10] causou uma redução na concentração plasmática de AGT no grupo controle (p=0,0130) enquanto que no grupo RA houve um aumento na concentração (p=0,0423) (Figura 8A). Ang-[1-8] foi 27% maior nos animais com RA comparados com os animais CT (Figura 8B). Nenhum outro efeito da RA sobre os peptídeos de angiotensina foi observado em condições as quais não houve estímulo da via. Entretanto quando os peptídeos foram quantificados após a infusão de Ang-[1-10], os peptídeos Ang-[1-10] (P<0,03) (Figura 8B), Ang-[1-8] (p<0,05) (Figura 8C), Ang-[2-10] (P<0,009) (Figura 8D), Ang-[2-8] (P<0,03) (Figura 8E), Ang-[3-8] (P<0,008) (Figura 8F), Ang-[1-5] (p<0,05) (Figura 8G) foram todos aumentados no grupo RA quando comparados com o CT diante o mesmo tratamento. A Tabela 2, demonstra todos os valores obtidos após a análise. A figura 8H representa a versão ilustrada dos resultados acima descritos.



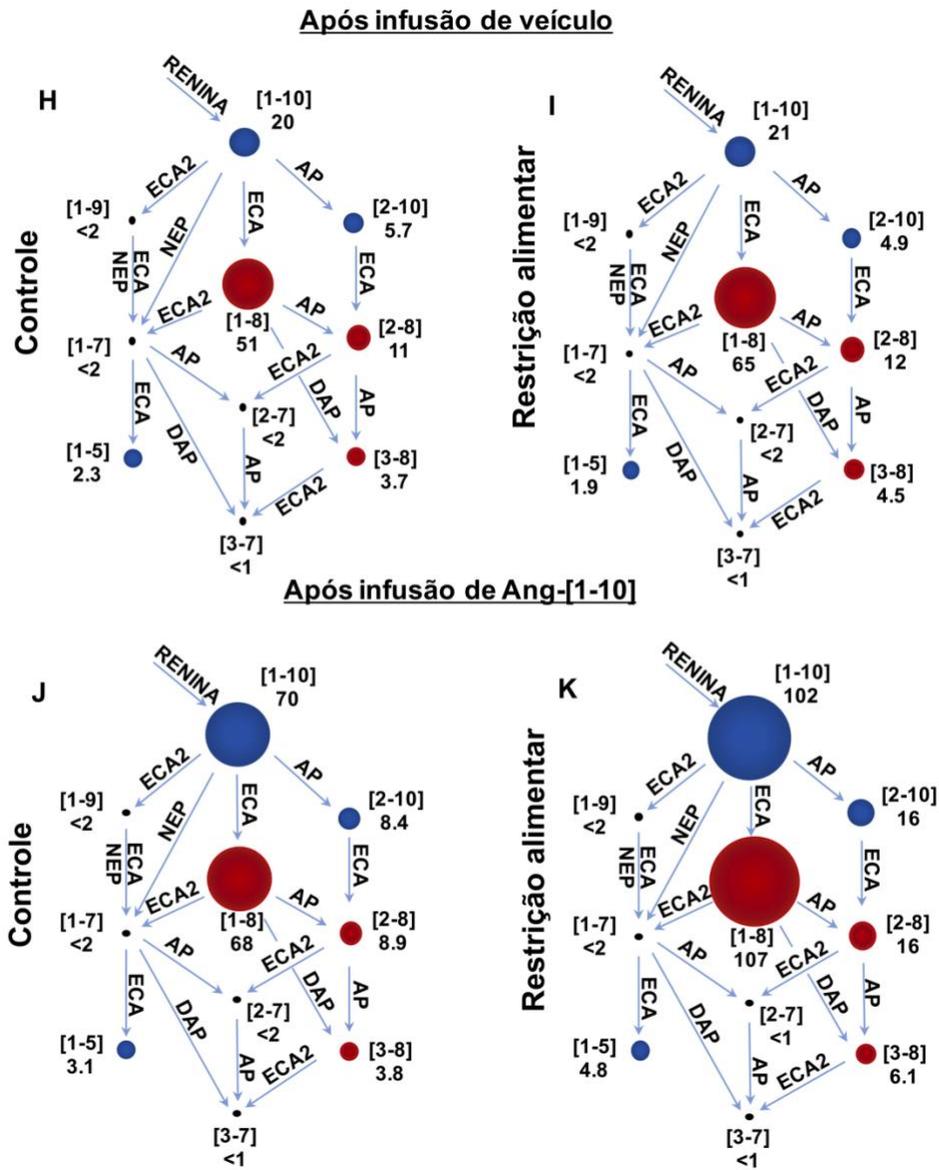


Figura 8: Efeito da restrição alimentar na concentração plasmática dos peptídeos de angiotensina e angiotensinogênio. Comparação concentração plasmática de AGEN após infusão de veículo ou Ang-[1-10] (A) (n=8/grupo), concentração dos peptídeos de angiotensina após infusão iv de veículo no grupo controle (B) e restrição alimentar (C) (n=10-11/grupo) e concentração dos mesmos peptídeos após infusão iv de Ang-[1-10] (D e E) (n=8/grupo). *P=0,0001 vs. CT, mesmo tratamento através do teste de variância ANOVA *two way* seguido do post teste de Bonferroni; #P<0,05 vs. veículo, mesmo grupo através do teste t de *Student*, não pareado.

Table 2: Efeito da restrição alimentar na concentração plasmática dos peptídeos do sistema renina-angotensina antes e após infusão iv. de Ang-[1-10]

Peptídeo	Infusão de veículo			Infusão de Ang-[1-10]			Veículo vs Ang-[1-10]	
	CT (pg/mL±SEM)	RA (pg/mL±SEM)	P valor	CT (pg/mL±SEM)	RA (pg/mL±SEM)	P valor	CT P value	FR P value
Ang-[1-10]	20,1 ± 1,3	20,8 ± 2,7	>0,9999	70,2 ± 9,5	101,9 ± 8,7	0,0021[‡]	<0,0001[#]	<0,0001[#]
Ang-[2-10]	5,9 ± 0,6	5,0 ± 0,5	0,9654	8,4 ± 0,8	15,6 ± 2,1	0,0003[‡]	0,0189	<0,0001[#]
Ang-[1-9]	<1,7 ± 0,04	<1,6 ± 0,05	N/A	<1,5 ± 0,1	<1,4 ± 0,03	N/A	N/A	N/A
Ang-[1-8]	50,7 ± 4,9	64,6 ± 3,5	0,0297[‡]	67,9 ± 7,1	107,2 ± 16,2	0,0464[‡]	0,0551	0,0060[#]
Ang-[1-7]	<2,2 ± 0,04	<2,1 ± 0,05	N/A	<1,6 ± 0,03	<1,6 ± 0,04	N/A	N/A	N/A
Ang-[2-8]	11,1 ± 1,2	11,5 ± 1,3	>0,9999	8,9 ± 1,3	16,0 ± 2,5	0,0147[‡]	0,2587	0,1172
Ang-[3-8]	3,7 ± 0,5	4,5 ± 0,3	0,4231	3,8 ± 0,3	6,1 ± 0,6	0,0039[‡]	0,9020	0,0233[#]
Ang-[2-7]	<2,3 ± 0,2	<1,9 ± 0,2	N/A	<1,2 ± 0,04	<1,1 ± 0,04	N/A	N/A	N/A
Ang-[3-7]	<1,2 ± 0,02	<1,2 ± 0,02	N/A	<1,2 ± 0,04	<1,1 ± 0,03	N/A	N/A	N/A
Ang-[1-5]	2,3 ± 0,2	2,0 ± 0,2	0,8849	3,1 ± 0,1	4,8 ± 0,6	0,0081[‡]	0,0166[#]	0,0001[#]

Concentração plasmática dos peptídeos de angiotensina em ratos controle (CT) e submetidas à restrição alimentar (RA). Números foram expressos como média ± SEM. [#] vs. veículo, mesmo grupo através do teste t de *Student*, não pareado. [‡] vs. CT no mesmo tratamento através do teste de variância ANOVA *two way* seguido do post teste de Bonferroni; (p<0,05). CT=10 vs RA =11 para infusão de veículo e CR=8 vs RA=8 para infusão de Ang-[1-10]. Números expressos com o sinal de “menor” (<) foram referentes a amostras com concentrações abaixo do limite de detecção. N/A = não se aplica.

4.7 Efeito da RA na expressão dos receptores AT₁, AT₂ e Mas nas artérias mesentéricas

A restrição alimentar aumentou aproximadamente 72% a expressão do RNAm dos receptores AT₁ em artérias mesentéricas de ratos submetidos à restrição alimentar (p<0,006) (Figura 9A). Entretanto, nenhuma alteração foi observada na expressão dos RNAm dos receptores AT₂ e Mas (Figura 9B e C).

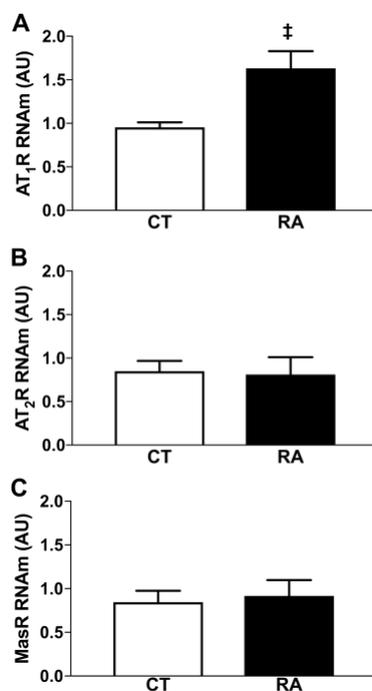


Figura 9: Efeito da restrição alimentar no RNAm dos receptores AT₁, AT₂ e Mas nas artérias mesentéricas. Comparação da variação na expressão dos RNAm dos receptores AT₁ (A), AT₂ (B) e Mas (C) em ratos controle (CT) e submetidas à restrição alimentar (RA) (n=8-9/grupo) [‡]P<0,006 vs. CT através da análise não pareada e teste t de *Student*.

4.8 Efeito da RA na responsividade ao Losartan (antagonista do receptor AT₁)

Quando realizada a comparação da variação da PAM no decorrer do tempo, observa-se que o Losartan causou uma resposta hipotensora no grupo RA ($p < 0,0001$) enquanto nenhum efeito significativo foi observado na FC. Quando se compara a amplitude da resposta, observa-se que a resposta foi similar a obtida em função do tempo, com uma redução maior na PAM no grupo com RA ($p < 0,05$) (Figura 9) enquanto nenhuma diferença ocorreu entre CT e RA na resposta cardíaca (Figura 9D).

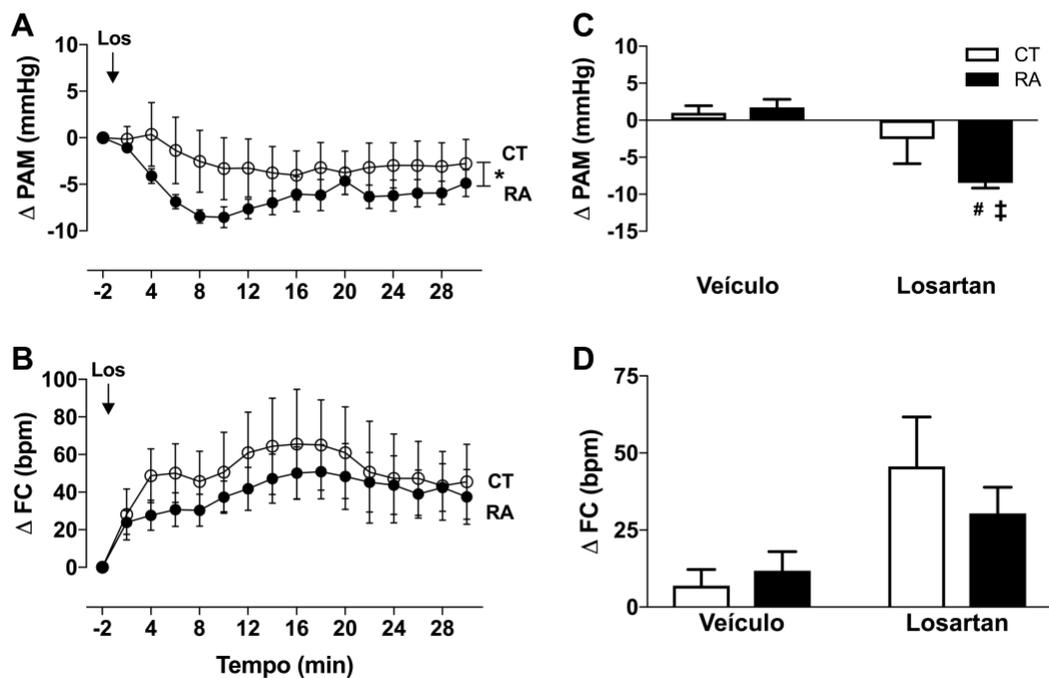


Figura 10: Efeito da restrição alimentar nos efeitos do bloqueio do receptor AT_1 sobre a PAM e FC. Comparação da variação da PAM (A) e FC (B) no decorrer do tempo e comparação da alteração máxima obtida para a PAM (C) e FC (D) após infusão iv de Losartan em relação aos valores basais em ratos controle (CT) submetidas à restrição alimentar (RA) (n=9-10/grupo). * $P < 0,0001$ vs. CT através do teste de ANOVA two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni (tempo; dieta). # $P < 0,05$ vs. veículo, mesmo grupo através da análise não pareada e teste t de Student e ‡ $p < 0,0001$ vs. CT, mesmo tratamento, através do teste de variância ANOVA two way, seguido do pos teste de Bonferroni.

4.9 Efeito da RA na responsividade à L-fenilefrina (agonista do receptor α_1 adrenérgico)

A infusão de L-fenilefrina aumentou a PAM (Figura 10B) igualmente em ambos grupos CT e RA quando se analisa a resposta máxima de cada grupo ($p = 0,8456$). Entretanto quando se avalia o efeito da dieta sobre a variação de PAM no decorrer do tempo, a L-fenilefrina gerou um efeito pressor menor no grupo RA ($p = 0,0088$) (figura 10A). Quando se compara a resposta obtida sobre a FC, no decorrer do tempo a L-fenilefrina causou uma bradicardia maior no grupo RA (Figura 9B) ($p < 0,0001$) e quando se compara a resposta máxima, essa também foi maior no grupo RA ($p = 0,0253$) (Figura 10D).

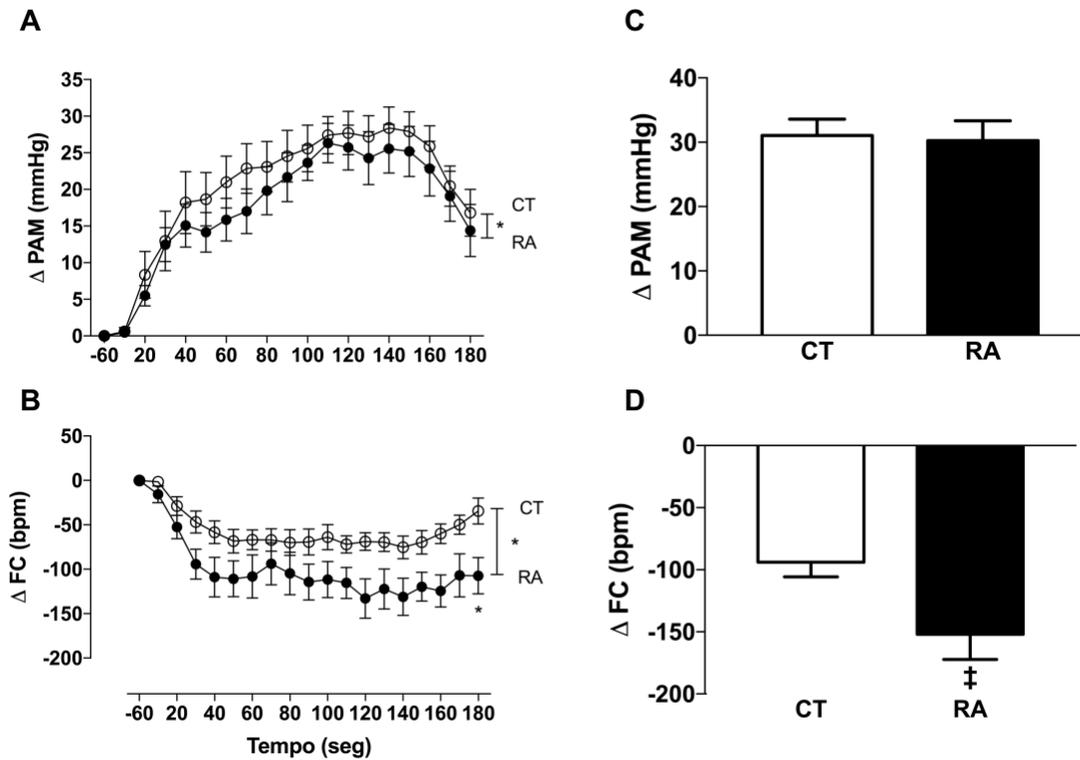


Figura 11: Efeito da restrição alimentar na ativação dos receptores α_1 -adrenérgicos sobre a PAM e FC. Comparação da variação da PAM (**A**) e FC (**B**) no decorrer do tempo e comparação da alteração máxima obtida para a PAM (**C**) e FC (**D**) após infusão iv de L-fenilefrina em relação aos valores basais em ratos controle (CT) submetidas à restrição alimentar (RA) (n=9/grupo). *P<0,001 vs. CT através do teste de ANOVA two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni (tempo; dieta). [‡]p<0,05 vs. CT, mesmo tratamento, através do teste de variância ANOVA two way, seguido do pós teste de Bonferroni.

5. Discussão

O principal resultado desse trabalho foi que o metabolismo plasmático do angiotensinogênio via Ang-[1-8] está *up-regulated* in ratas Fischer após duas semanas de restrição alimentar severa e a infusão de Ang-[1-10] nesses animais ativa um mecanismo de *feedback* positivo que parece ser constante. Além disso, a expressão dos receptores AT₁ foi aumentada pela RA em vasos mesentéricos e mesmo nessas condições a resposta pressora causada pela infusão de Ang-[1-8] foi menor. Esses resultados sugerem que a via da Ang-[1-8] está altamente estimulada, porém com um limite máximo de resposta. Essa responsividade reduzida parece ser independente da capacidade vasoconstritora do vaso, mas decorrente da possível dessensitização do receptor AT₁. Todas essas alterações na via da angiotensina ocorrem em compensação à hipotensão e baixo volume plasmático presente na RA.

RA altera parâmetros hemodinâmicos e eletrolíticos

Como previamente demonstrado, duas semanas de RA causou uma redução no peso corporal, além de reduzir a PAM e FC (Tabela 1) (19, 135). Casos de hipotensão e bradicardia são muito comuns em restrições alimentares severas, como por exemplo, na anorexia nervosa (136, 137). Além disso, esses pacientes também apresentam redução do volume plasmático o que gera aumento no hematócrito (138), o mesmo tipo de resposta obtido após a RA (Tabela 1). E como é bem estabelecido, a redução do volume plasmático é associada com a redução da pressão arterial (139).

A hipoalbuminemia na RA observada em trabalhos anteriores, pode ser o principal fator que contribuiu para a hipotensão. Sabe-se que baixos níveis de albumina estão presentes em casos de desnutrição proteica (19, 138, 140). A albumina é um fator importantíssimo para controle da osmolaridade plasmática e é demonstrado que a baixa concentração plasmática de proteína ocasiona baixa osmolaridade sanguínea e conseqüente acúmulo de água no espaço intercelular, causando edema e baixo volume sanguíneo (141). Além disso, é bem estabelecido que o sistema renina angiotensina pode ser estimulado por mudanças na osmolaridade e volume sanguíneo (142).

Outro problema muito comum em casos de restrição alimentar é o desequilíbrio eletrolítico, o qual também pode contribuir com a hipotensão (138). A RA reduziu a concentração plasmática de potássio (Tabela 1), no entanto a causa da hipocalcemia nesse modelo ainda não é

clara, mas acredita-se que pode ser devido a depleção do estoque de potássio associado com a baixa ingestão, má absorção, problemas renais ou secundária ao possível hiperaldosteronismo (138, 143). Sabe-se que a baixa concentração de potássio em casos de pacientes com RA é uma das principais causas das complicações cardiovasculares e desenvolvimento de problemas cardíacos (144). Baixos níveis de potássio também são observados em casos de insuficiência renal e acredita-se serem decorrentes à má nutrição pré-existente que ocorre nesses pacientes e que se correlacionam com a severidade e mortalidade nessa patologia (145). Outro parâmetro avaliado foi a concentração de sódio plasmático, o qual não apresentou diferenças significativas entre os grupos (Tabela 1). Embora a concentração de sódio tenha sido a mesma, não se sabe como estão os reservatórios de sódio (pele e ossos) e o quanto está sendo mobilizado para a circulação (146, 147). No entanto se levar em consideração a redução do volume plasmático presente na RA, a concentração de sódio pode não ter sido reduzida, porém a quantidade de sódio total está baixa. O volume plasmático intravascular também pode ser regulado pela quantidade de sódio que é absorvido pelo rim. Assim, diminuição na reabsorção de sódio e dietas restritas em sódio representam mecanismos através do qual o volume plasmático é reduzido, reduzindo a PA (148).

Concentração plasmática aumentada de Ang-[1-8]

A primeira proteína da via da angiotensina é o AGT. Quando a concentração desse precursor foi analisada, observou-se que a RA causou um aumento da concentração plasmática de AGT (Figura 8). Diversos são os estímulos e vias de controle para síntese e liberação do AGT. O AGT pode ter sua produção estimulada ou inibida pela Ang-[1-8] ou por citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-6. A resposta de estimulação ou inibição vai depender de qual via de sinalização intracelular está sendo ativada, se é via STAT1 ou STAT3 (33, 34), porém ainda não se sabe o que leva a preferência de ativação de cada uma. No caso da RA acredita-se que ambos fatores, citocinas e Ang-[1-8], possam estar contribuindo para o aumento de AGT, pois sabe-se que pessoas com baixo consumo alimentar desenvolvem um perfil de respostas pro-inflamatória com aumento da produção de IL-6 e TNF- α (149, 150). E no caso da Ang-[1-8] é bem estabelecido que reduções no volume plasmático ou na concentração de sódio são estímulos para produção de Ang-[1-8] (151). Quando há hipovolemia, como no caso de hemorragia, ocorre um aumento da concentração plasmática de Ang-[1-8] através do aumento na atividade da ECA (152). Como resultado do aumento na concentração de Ang-[1-8], haverá vasoconstrição nos vasos de resistência na tentativa de recuperar e manter a pressão arterial em níveis normais. Assim, a

redução do volume plasmático em consequência à RA pode ser o gatilho para o aumento da produção de Ang-[1-8] (Figura 8) através do aumento da atividade da ECA (Figure 4 e 7). Interessantemente, uma resposta não esperada foi a atividade da renina ter sido a mesma nos grupos CT e RA, assim como a concentração da Ang-[1-10], porém o oposto da Ang-[1-8], a qual foi aumentada (Figura 8). Em um experimento utilizando fatias de fígado de ratos foi observado que após serem tratadas com Ang-[1-8], houve um aumento na síntese e liberação de AGT e na concentração de Ang-[1-8]. Entretanto, a concentração de renina foi reduzida, assim como a da Ang-[1-10] (61). Essa resposta de inibição da renina pelo excesso de Ang-[1-8] pode ser o fator que está limitando a ação da renina na RA, acumulando AGT e mantendo normais as concentrações de Ang-[1-10]. Acredita-se que o aumento da Ang-[1-8] na RA pode ser a soma do catabolismo normal da Ang-[1-10] com a ação de cinases e catepsinas, tonina que agem sobre o AGT produzindo Ang-[1-8] de forma independente da renina e Ang-[1-10]. A via independente da renina pode ocorrer através da conversão do AGT em Ang-[1-12] ou de forma direta à Ang-[1-8] (35-37, 153).

Outro efeito da RA na via da angiotensina foi no aumento da atividade da ECA2 (Figura 7), sendo esta uma das responsáveis pelo catabolismo da Ang-[1-8]. A ativação da ECA2 pode ser um mecanismo contra-regulatório iniciado com o aumento da ECA. Estudos anteriores mostraram que essas duas enzimas podem agir de forma coordenada sinérgica ou pode acontecer um efeito “*ying-yang*”. Um estudo em ratos espontaneamente hipertensos mostrou que as expressões de proteínas e RNAm da ECA foram aumentadas no núcleo paraventricular do hipotálamo enquanto a ECA2 teve sua expressão de proteínas e RNAm reduzida quando comparadas com ratos controle, Wistar-Kyoto (154). Entretanto, a expressão da proteína/RNAm de ambas enzimas, ECA e ECA2, foi reduzida nos túbulos renais de um modelo animal com nefropatia diabética (155).

Alguns estudos investigaram os efeitos da restrição calórica ou restrição proteica na atividade da ECA e ECA2. Um estudo apresentou que restringindo as calorias em 30% no período periconcepcional de ovelhas eutróficas, houve um aumento na expressão da proteína e RNAm da ECA (156). Outro estudo mostrou ainda que pacientes com restrição alimentar, como no caso da anorexia nervosa, tiveram baixa atividade plasmática da ECA quando comparados a pessoas eutróficas da mesma faixa etária (157). Entretanto, o método utilizado nesse último estudo para quantificar a atividade enzimática foi o colorimétrico, o qual é pouco utilizado pela baixa confiabilidade na disponibilidade de substratos específicos.

No intuito de determinar a reatividade do SRA, experimentos com infusão de Ang-[1-10] foram realizados nos animais CT e FR. Primeiramente após a infusão de Ang-[1-10] houve uma

resposta pressora maior no grupo RA a qual pode ter sido ocasionada diretamente através da sua conversão à Ang-[1-8] pela ação da ECA. Essa resposta pode-se dizer que foi mediada pela ECA, pois após o uso do captopril o efeito pressor da Ang-[1-10] foi bloqueado. Para melhor compreensão do mecanismo dessa resposta, os peptídeos de angiotensina foram quantificados após a infusão iv da Ang-[1-10]. Nessa análise, pode-se observar um aumento na concentração de Ang-[1-10] e Ang-[1-8] plasmática, assim como de outros metabólitos de angiotensina que incluem a Ang-[2-10], Ang-[2-8] e Ang-[3-8] (Tabela 2). Esses resultados sugerem que o SRA demonstrou ainda ser reativo na RA através do aumento na atividade da via metabólica da Ang-[1-8] através da ECA e possivelmente da Aminopeptidase A (Figura 8). A RA também atenuou a resposta da FC quando Ang-[1-10] foi injetada, provavelmente decorrente da ativação do barorreflexo (Figura 4). É bem estabelecido que em resposta a um aumento agudo na pressão arterial, a frequência cardíaca é diminuída na tentativa de reduzir a pressão arterial e manter a homeostasia (158). Assim, sugerimos que a Ang-[1-10] induziu aumento na PAM que ativou a resposta barorreflexa resultando na redução compensatória da FC.

Contudo, um fato curioso foi observado após a quantificação dos peptídeos de Ang em resposta ao estímulo de Ang-[1-10], pois este além de alterar os peptídeos já acima mencionados, reduziu a concentração plasmática de AGT no grupo controle e aumentou no grupo RA. Essa resposta pode ter sido mediada por mecanismos distintos de controle ativados em cada grupo. Acredita-se que infusão de Ang-[1-10] induziu um mecanismo de feedback negativo no grupo CT, inibindo a liberação de AGT pelo fígado, enquanto que na RA houve um feedback positivo com possível exacerbação da síntese hepática de AGT mediada pelo aumento de Ang-[1-8]. Existem relatos na literatura que o aumento de Ang-[1-8] pode ativar a síntese de angiotensinogenio ou/e inibir a ação da renina e acredita-se que esse efeito positivo de *loop* no grupo RA pode ser o que corroborou à resposta pressora pronunciada da Ang-[1-10] e ao aumento da concentração dos peptídeos relacionados ao metabolismo da Ang-[1-8] (61). Essa resposta de ativação do SRA em *loop* é um fator que deve ser cuidadosamente analisado, pois pode ser uma das causas do excesso de ativação do SRA ocasionando a longo prazo danos teciduais, endoteliais e problemas cardio-renais.

Aumento na expressão do receptor AT₁

Com o aumento da concentração plasmática da Ang-[1-8] e maior resposta pressora da Ang-[1-10] na RA torna-se necessária a investigação dos receptores de angiotensina que podem estar mediando essas respostas. Recentemente nós demonstramos que a responsividade dos

receptores α 1-adrenergicos estava aumentada em ratos com RA (19) contribuindo para a homeostase da pressão arterial através do aumento da pressão de perfusão. Vários estudos vêm demonstrando que a resposta simpática é modulada pelo sistema renina angiotensina (159, 160). No atual trabalho, nós demonstramos que o receptor AT_1 , assim como os receptores α 1-adrenergicos, pode estar contribuindo para a manutenção dos níveis de pressão arterial próximos aos normais durante a RA através do aumento da sua expressão nos vasos mesentéricos (Figura 9). Esse aumento na expressão dos receptores AT_1 pode ser uma resposta compensatória a hipotensão ocasionada pela RA na tentativa de causar vasoconstrição dos vasos de resistência e em resposta ao aumento de Ang-[1-8] circulante. Nossos resultados corroboram aos estudos que demonstraram que a baixa ingestão de proteínas aumentou a quantidade do receptor AT_1 na aorta de ratos (161).

Levando em consideração que a RA não teve efeito na expressão dos receptores AT_2 e Mas (Figura 9), sugere-se que esses receptores de angiotensina não estão sendo recrutados significativamente em resposta à hipotensão e bradicardia nesse modelo. Quase não há estudos na literatura correlacionando o receptor AT_2 com deficiências nutricionais e nenhum estudo foi encontrado até o momento quando o foco é sobre o receptor Mas e dietas de baixo consumo calórico e proteico. Em um dos poucos estudos que investigaram a influência de dietas no receptor AT_2 , eles analisaram ovelhas prenhas submetidas ao protocolo de 50% de restrição alimentar entre os dias 28 a 78 de gestação e os resultados foram que os filhotes desenvolveram hipertensão juntamente com aumento na expressão do RNAm do receptor AT_2 na medula renal (162).

Como nem todo RNAm é traduzido em proteína funcional, assim, torna-se necessário avaliar a funcionalidade do receptor AT_1 e sua importância no controle da PAM na RA. Sendo assim, foi realizada uma infusão iv de losartan, antagonista do receptor AT_1 , em ambos grupos (Figura 10). Alguns minutos após a infusão do losartan houve uma redução mais acentuada na PAM dos animais com RA comparada com CT. Esse efeito na RA suporta a ideia de que a RA aumenta a expressão dos receptores AT_1 assim como aumenta seu efeito na vasoconstrição endotelial. Outra possibilidade de controle da pressão arterial via AT_1 é através da função renal, o qual na presença de losartan pode inibir a reabsorção de sódio através do néfron, ocasionando a redução da PA. Esses resultados são consistentes com estudos publicados anteriormente utilizando ratos tratados com baixa ingestão proteica, os quais apresentaram a mesma resposta hipotensora mais acentuada mediante infusão iv de losartan (161).

Efeito pressor reduzido da Ang-[1-8]

O que pode ser consistente com a hipotensão, nós observamos que a infusão de Ang-[1-8] causou um aumento menor na PAM dos animais com RA comparados com a resposta do grupo CT (Figura 5). Esses resultados sugerem que mesmo que a concentração plasmática de Ang-[1-8] e a expressão do receptor AT_1 estejam aumentados, os mecanismos de controle da PAM mediados pela Ang-[1-8] foram insuficientes para superar a redução na PAM induzida pelo baixo volume plasmático. Respostas similares foram observadas em pacientes com anorexia nervosa. Nesse estudo, pacientes diagnosticados com anorexia tiveram que receber uma infusão uma solução de Ang-[1-8] mais concentrada que o grupo controle para gerar a mesma resposta de aumento na PAM de 20mmHg (163).

Baseado nos resultados até o momento apresentados, acreditava-se que a resposta atenuada da Ang-[1-8] poderia ser decorrente de uma resposta máxima na habilidade vasoconstritora do vaso. Um estudo mostrou que camundongos hipotensos associados com severa depleção de volume intravascular em consequência da redução na reabsorção renal de Na^+ , tiveram diminuída reatividade de contratilidade como consequência da reduzida hipertrofia vascular (148). Porém, essa ideia da contratilidade de vaso prejudicada não foi suportada após a infusão iv de fenilefrina, um agonista α_1 adrenérgico, (Figura 11), o qual causou a mesma resposta pressora em ambos os grupos. Entretanto, essa resposta de contratilidade prejudicada é específica e dependente do receptor AT_1 , a qual pode ocorrer por motivos como saturação, dessensibilização do receptor AT_1 ou reduzida hipertrofia vascular, não respondendo tão eficientemente à Ang-[1-8]. Respostas similares podem ser observadas em camundongos com sepse, os quais desenvolveram hipotensão e na mesma hora a sensibilidade da vasculatura renal a Ang-[1-8] foi reduzida devido a possível dessensibilização do receptor AT_1 (164). Sabe-se também que o eixo Ang-[1-8]/ AT_1 está envolvido no desencadeamento de disfunções endoteliais (43). Disfunções endoteliais relacionadas à angiotensina parecem ser caracterizadas pela menor produção de óxido nítrico e maior e espécies reativas de oxigênio, levando a uma vasoconstrição aumentada, proliferação celular e inflamação (165). Sabendo que na RA ocorre uma redução plasmática de óxido nítrico (19), seria esse mais um fator que contribuiria para a baixa responsividade a infusão de angiotensina.

O heptapeptideo, Ang-[1-7], foi anteriormente demonstrado possuir um efeito vasodilator (166); Porém, mesmo sabendo que os vasos sanguíneos são um local importante para produção e ação da Ang-[1-7] (167), os efeitos da Ang-[1-7] ainda são contraditórios. Sasaki e cols (168) demonstraram ocorrer vasodilatação no antebraço de humanos após infusão de Ang-[1-7], enquanto que McMurray e cols (169) não observaram efeitos da Ang-[1-7] sobre a dilatação do

vaso. Ambos experimentos foram realizados em pacientes normotensos. Em um outro experimento realizados com ratos espontaneamente hipertensos mantidos em dietas com baixo teor de sódio (0,05%), as concentrações plasmáticas e renais de Ang-[1-10] e Ang-[1-8] foram altas em relação ao controle, enquanto nenhuma diferença foi observada nos níveis plasmáticos e renais da Ang-[1-7]. Embora a concentração da Ang-[1-7] não foi afetada no modelo animal de hipertensão após a restrição na ingestão de sódio, o hipotensivo efeito do receptor sobre a pressão arterial foi mais acentuado no grupo com baixa ingestão de sódio (170). No caso do modelo de RA, a infusão aguda do peptídeo não teve efeito no grupo CT e somente causou um aumento pequeno na PAM e HR dos animais com RA (Figura 6), assim como não houve alterações na expressão do receptor Mas (Figura 9). Devido a baixa concentração plasmática de Ang-[1-7], não foi possível quantificar esse peptídeo em situação basal ou mesmo após estimulação com Ang-[1-10] devido o limite de sensibilidade para detecção da técnica utilizada (Tabela 2). Não se sabe sobre a funcionalidade do receptor Mas na RA, entretanto nossos resultados sugerem que a Ang-[1-7] não é o maior contribuidor para a homeostase da pressão arterial nesses animais com RA.

6. Conclusão

Em conclusão, sugerimos que a RA diminui o volume sanguíneo devido a redução da concentração plasmática de albumina e sódio, causando uma resposta depressora. Na tentativa de manter a pressão de perfusão, o sistema renina angiotensina é ativado. Assim, a RA aumentou o metabolismo do AGT à Ang-[1-8], com aumento na atividade da ECA. Além disso, a RA aumentou a atividade do receptor AT₁, o que é demonstrado através do aumento da expressão do seu RNAm em vasos de resistência e da responsividade ao bloqueio do receptor AT₁. Enquanto a regulação positiva da via metabólica da angiotensina ocorre em forma de loop na tentativa de atingir a homeostase da pressão arterial e assim a sobrevivência dos animais, a ativação constante desse sistema pode contribuir, a longo prazo, a complicações no sistema cardiovascular e renal observadas em indivíduos que passaram ou passam por situações de baixa ingestão alimentar. Contudo, será importante investigar os mecanismos pelos quais a restrição alimentar reprograma a ativação do sistema renina angiotensina e as consequências dessa hiper-estimulação a longo prazo no sistema cardiovascular e renal.

7. Referências Bibliográficas

1. DiVasta AD, Walls CE, Feldman HA, Quach AE, Woods ER, Gordon CM, et al. Malnutrition and hemodynamic status in adolescents hospitalized for anorexia nervosa. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2010;164(8):706-13.
2. Hecker LM, Kotler DP. Malnutrition in patients with AIDS. *Nutr Rev.* 1990;48(11):393-401.
3. Barajas Galindo DE, Vidal-Casariiego A, Calleja-Fernandez A, Hernandez-Moreno A, Pintor de la Maza B, Pedraza-Lorenzo M, et al. Appetite disorders in cancer patients: Impact on nutritional status and quality of life. *Appetite.* 2017;114:23-7.
4. Victora CG, Vaughan JP, Kirkwood BR, Martines JC, Barcelos LB. Risk factors for malnutrition in Brazilian children: the role of social and environmental variables. *Bull World Health Organ.* 1986;64(2):299-309.
5. Muller O, Krawinkel M. Malnutrition and health in developing countries. *CMAJ.* 2005;173(3):279-86.
6. McDonald RB, Ramsey JJ. Honoring Clive McCay and 75 years of calorie restriction research. *J Nutr.* 2010;140(7):1205-10.
7. Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science.* 2009;325(5937):201-4.
8. Thompson HJ, Jiang W, Zhu Z. Mechanisms by which energy restriction inhibits carcinogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 1999;470:77-84.
9. Loft S, Velthuis-te Wierik EJ, van den Berg H, Poulsen HE. Energy restriction and oxidative DNA damage in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1995;4(5):515-9.
10. Redman LM, Ravussin E. Caloric restriction in humans: impact on physiological, psychological, and behavioral outcomes. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(2):275-87.
11. Noyan H, El-Mounayri O, Isserlin R, Arab S, Momen A, Cheng HS, et al. Cardioprotective Signature of Short-Term Caloric Restriction. *PLoS One.* 2015;10(6):e0130658.
12. Garcia-Prieto CF, Fernandez-Alfonso MS. Caloric Restriction as a Strategy to Improve Vascular Dysfunction in Metabolic Disorders. *Nutrients.* 2016;8(6).
13. Maklakov AA. Aging: why do organisms live too long? *Curr Biol.* 2013;23(22):R1003-5.
14. Szafranski K, Mekhail K. The fine line between lifespan extension and shortening in response to caloric restriction. *Nucleus.* 2014;5(1):56-65.
15. Piper MD, Bartke A. Diet and aging. *Cell Metab.* 2008;8(2):99-104.

16. Anton S, Leeuwenburgh C. Fasting or caloric restriction for healthy aging. *Exp Gerontol.* 2013;48(10):1003-5.
17. Pinotti MF, Leopoldo AS, Silva MD, Sugizaki MM, do Nascimento AF, Lima-Leopoldo AP, et al. A comparative study of myocardial function and morphology during fasting/refeeding and food restriction in rats. *Cardiovasc Pathol.* 2010;19(5):e175-82.
18. Hilderman T, McKnight K, Dhalla KS, Rupp H, Dhalla NS. Effects of long-term dietary restriction on cardiovascular function and plasma catecholamines in the rat. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1996;10 Suppl 1:247-50.
19. de Souza AA, de Menezes RC, Abreu AR, Araujo GR, Costa DC, Chianca DA, Jr. Increased alpha1-adrenoreceptor activity is required to sustain blood pressure in female rats under food restriction. *Life Sci.* 2015;128:55-63.
20. Williamson CR, Khurana S, Nguyen P, Byrne CJ, Tai TC. Comparative Analysis of Renin-Angiotensin System (RAS)-Related Gene Expression Between Hypertensive and Normotensive Rats. *Med Sci Monit Basic Res.* 2017;23:20-4.
21. Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. Studies on Experimental Hypertension : I. The Production of Persistent Elevation of Systolic Blood Pressure by Means of Renal Ischemia. *J Exp Med.* 1934;59(3):347-79.
22. Braun-Menendez E, Fasciolo JC, Leloir LF, Munoz JM. The substance causing renal hypertension. *J Physiol.* 1940;98(3):283-98.
23. Braun-Menendez E, Page IH. Suggested Revision of Nomenclature--Angiotensin. *Science.* 1958;127(3292):242.
24. Skeggs LT, Jr., Marsh WH, Kahn JR, Shumway NP. The existence of two forms of hypertensin. *J Exp Med.* 1954;99(3):275-82.
25. Skeggs LT, Jr., Kahn JR, Shumway NP. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J Exp Med.* 1956;103(3):295-9.
26. Danser AH. Cardiac angiotensin II: does it have a function? *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;299(5):H1304-6.
27. van Kats JP, Danser AH, van Meegen JR, Sassen LM, Verdouw PD, Schalekamp MA. Angiotensin production by the heart: a quantitative study in pigs with the use of radiolabeled angiotensin infusions. *Circulation.* 1998;98(1):73-81.
28. van Kats JP, Schalekamp MA, Verdouw PD, Duncker DJ, Danser AH. Intrarenal angiotensin II: interstitial and cellular levels and site of production. *Kidney Int.* 2001;60(6):2311-7.
29. Lu H, Cassis LA, Kooi CW, Daugherty A. Structure and functions of angiotensinogen. *Hypertens Res.* 2016;39(7):492-500.

30. Thomas WG, Greenland KJ, Shinkel TA, Sernia C. Angiotensinogen is secreted by pure rat neuronal cell cultures. *Brain Res.* 1992;588(2):191-200.
31. Ding Y, Davisson RL, Hardy DO, Zhu LJ, Merrill DC, Catterall JF, et al. The kidney androgen-regulated protein promoter confers renal proximal tubule cell-specific and highly androgen-responsive expression on the human angiotensinogen gene in transgenic mice. *J Biol Chem.* 1997;272(44):28142-8.
32. Wu C, Lu H, Cassis LA, Daugherty A. Molecular and Pathophysiological Features of Angiotensinogen: A Mini Review. *N Am J Med Sci (Boston).* 2011;4(4):183-90.
33. Satou R, Gonzalez-Villalobos RA. JAK-STAT and the renin-angiotensin system: The role of the JAK-STAT pathway in blood pressure and intrarenal renin-angiotensin system regulation. *JAKSTAT.* 2012;1(4):250-6.
34. Sernia C. Location and secretion of brain angiotensinogen. *Regul Pept.* 1995;57(1):1-18.
35. Ramaha A, Patston PA. Release and degradation of angiotensin I and angiotensin II from angiotensinogen by neutrophil serine proteinases. *Arch Biochem Biophys.* 2002;397(1):77-83.
36. Araujo RC, Lima MP, Lomez ES, Bader M, Pesquero JB, Sumitani M, et al. Tonin expression in the rat brain and tonin-mediated central production of angiotensin II. *Physiol Behav.* 2002;76(2):327-33.
37. Lippoldt A, Paul M, Fuxe K, Ganten D. The brain renin-angiotensin system: molecular mechanisms of cell to cell interactions. *Clin Exp Hypertens.* 1995;17(1-2):251-66.
38. Gironacci MM, Cerniello FM, Longo Carbajosa NA, Goldstein J, Cerrato BD. Protective axis of the renin-angiotensin system in the brain. *Clin Sci (Lond).* 2014;127(5):295-306.
39. Ferrario CM, Ahmad S, Varagic J, Cheng CP, Groban L, Wang H, et al. Intracrine angiotensin II functions originate from noncanonical pathways in the human heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2016;311(2):H404-14.
40. Lavoie JL, Sigmund CD. Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system. *Endocrinology.* 2003;144(6):2179-83.
41. Warner FJ, Smith AI, Hooper NM, Turner AJ. Angiotensin-converting enzyme-2: a molecular and cellular perspective. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(21):2704-13.
42. Karnik SS, Unal H, Kemp JR, Tirupula KC, Eguchi S, Vanderheyden PM, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIX. Angiotensin Receptors: Interpreters of Pathophysiological Angiotensinergic Stimuli [corrected]. *Pharmacol Rev.* 2015;67(4):754-819.
43. Luscher TF. Endothelial dysfunction: the role and impact of the renin-angiotensin system. *Heart.* 2000;84 Suppl 1:i20-2:discussion i50.

44. Hajnoczky G, Csordas G, Bago A, Chiu AT, Spat A. Angiotensin II exerts its effect on aldosterone production and potassium permeability through receptor subtype AT1 in rat adrenal glomerulosa cells. *Biochem Pharmacol.* 1992;43(5):1009-12.
45. Shinohara K, Kishi T, Hirooka Y, Sunagawa K. Circulating angiotensin II deteriorates left ventricular function with sympathoexcitation via brain angiotensin II receptor. *Physiol Rep.* 2015;3(8).
46. Yamamoto T, Hayashi K, Matsuda H, Kubota E, Tanaka H, Ogasawara Y, et al. In vivo visualization of angiotensin II- and tubuloglomerular feedback-mediated renal vasoconstriction. *Kidney Int.* 2001;60(1):364-9.
47. Chen L, Kim SM, Eisner C, Oppermann M, Huang Y, Mizel D, et al. Stimulation of renin secretion by angiotensin II blockade is G α -dependent. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(6):986-92.
48. Harrison-Bernard LM. The renal renin-angiotensin system. *Adv Physiol Educ.* 2009;33(4):270-4.
49. Peach MJ. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev.* 1977;57(2):313-70.
50. Ribeiro AA, Palomino Z, Lima MP, Souza LE, Ferreira DS, Pesquero JB, et al. Characterization of the renal renin-angiotensin system in transgenic mice that express rat tonin. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2015;16(4):947-55.
51. von Bohlen und Halbach O, Albrecht D. The CNS renin-angiotensin system. *Cell Tissue Res.* 2006;326(2):599-616.
52. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 2000;87(5):E1-9.
53. Pereira MG, Souza LL, Becari C, Duarte DA, Camacho FR, Oliveira JA, et al. Angiotensin II-independent angiotensin-(1-7) formation in rat hippocampus: involvement of thimet oligopeptidase. *Hypertension.* 2013;62(5):879-85.
54. Velez JC. Prolyl carboxypeptidase: a forgotten kidney angiotensinase. Focus on "Identification of prolyl carboxypeptidase as an alternative enzyme for processing of renal angiotensin II using mass spectrometry". *Am J Physiol Cell Physiol.* 2013;304(10):C939-40.
55. Santos RA, Brosnihan KB, Chappell MC, Pesquero J, Chernicky CL, Greene LJ, et al. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension.* 1988;11(2 Pt 2):1153-7.

56. Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Baracho NC, Fontes MA, Silva LC, Neves LA, et al. Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7): evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Res Bull.* 1994;35(4):293-8.
57. Kucharewicz I, Pawlak R, Matys T, Chabielska E, Buczek W. Angiotensin-(1-7): an active member of the renin-angiotensin system. *J Physiol Pharmacol.* 2002;53(4 Pt 1):533-40.
58. Santos RA, Ferreira AJ, Simoes ESAC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol.* 2008;93(5):519-27.
59. Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(14):8258-63.
60. Verdecchia P, Angeli F, Mazzotta G, Gentile G, Reboldi G. The renin angiotensin system in the development of cardiovascular disease: role of aliskiren in risk reduction. *Vasc Health Risk Manag.* 2008;4(5):971-81.
61. Hermann K, Raizada MK, Sumners C, Phillips MI. Presence of renin in primary neuronal and glial cells from rat brain. *Brain Res.* 1987;437(2):205-13.
62. Xu D, Borges GR, Davis DR, Agassandian K, Sequeira Lopez ML, Gomez RA, et al. Neuron- or glial-specific ablation of secreted renin does not affect renal renin, baseline arterial pressure, or metabolism. *Physiol Genomics.* 2011;43(6):286-94.
63. Sparks MA, Crowley SD, Gurley SB, Mirotso M, Coffman TM. Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. *Compr Physiol.* 2014;4(3):1201-28.
64. Persson PB. Renin: origin, secretion and synthesis. *J Physiol.* 2003;552(Pt 3):667-71.
65. DiBona GF. Neural control of the kidney: functionally specific renal sympathetic nerve fibers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;279(5):R1517-24.
66. Ehlers MR, Riordan JF. Angiotensin-converting enzyme: zinc- and inhibitor-binding stoichiometries of the somatic and testis isozymes. *Biochemistry.* 1991;30(29):7118-26.
67. Cushman DW, Cheung HS. Concentrations of angiotensin-converting enzyme in tissues of the rat. *Biochim Biophys Acta.* 1971;250(1):261-5.
68. Falkenhahn M, Franke F, Bohle RM, Zhu YC, Stauss HM, Bachmann S, et al. Cellular distribution of angiotensin-converting enzyme after myocardial infarction. *Hypertension.* 1995;25(2):219-26.
69. Danilov SM, Sadovnikova E, Scharenborg N, Balyasnikova IV, Svinareva DA, Semikina EL, et al. Angiotensin-converting enzyme (CD143) is abundantly expressed by dendritic cells and

discriminates human monocyte-derived dendritic cells from acute myeloid leukemia-derived dendritic cells. *Exp Hematol*. 2003;31(12):1301-9.

70. Bernstein KE, Shen XZ, Gonzalez-Villalobos RA, Billet S, Okwan-Duodu D, Ong FS, et al. Different in vivo functions of the two catalytic domains of angiotensin-converting enzyme (ACE). *Curr Opin Pharmacol*. 2011;11(2):105-11.

71. Baltatu O, Nishimura H, Hoffmann S, Stoltenburg G, Haulica ID, Lippoldt A, et al. High levels of human chymase expression in the pineal and pituitary glands. *Brain Res*. 1997;752(1-2):269-78.

72. Whiting P, Nava S, Mozley L, Eastham H, Poat J. Expression of angiotensin converting enzyme mRNA in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 1991;11(1):93-6.

73. Rogerson FM, Schlawe I, Paxinos G, Chai SY, McKinley MJ, Mendelsohn FA. Localization of angiotensin converting enzyme by in vitro autoradiography in the rabbit brain. *J Chem Neuroanat*. 1995;8(4):227-43.

74. Ching SF, Hayes LW, Slakey LL. Angiotensin-converting enzyme in cultured endothelial cells. Synthesis, degradation, and transfer to culture medium. *Arteriosclerosis*. 1983;3(6):581-8.

75. Danilov SM, Gavriluk VD, Franke FE, Pauls K, Harshaw DW, McDonald TD, et al. Lung uptake of antibodies to endothelial antigens: key determinants of vascular immunotargeting. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;280(6):L1335-47.

76. Parkin ET, Turner AJ, Hooper NM. Secretase-mediated cell surface shedding of the angiotensin-converting enzyme. *Protein Pept Lett*. 2004;11(5):423-32.

77. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem*. 2000;275(43):33238-43.

78. Reis FM, Bouissou DR, Pereira VM, Camargos AF, dos Reis AM, Santos RA. Angiotensin-(1-7), its receptor Mas, and the angiotensin-converting enzyme type 2 are expressed in the human ovary. *Fertil Steril*. 2011;95(1):176-81.

79. Soler MJ, Ye M, Wysocki J, William J, Lloveras J, Battle D. Localization of ACE2 in the renal vasculature: amplification by angiotensin II type 1 receptor blockade using telmisartan. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;296(2):F398-405.

80. Ye M, Wysocki J, William J, Soler MJ, Cokic I, Battle D. Glomerular localization and expression of Angiotensin-converting enzyme 2 and Angiotensin-converting enzyme: implications for albuminuria in diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(11):3067-75.

81. Yamazato M, Yamazato Y, Sun C, Diez-Freire C, Raizada MK. Overexpression of angiotensin-converting enzyme 2 in the rostral ventrolateral medulla causes long-term decrease in blood pressure in the spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2007;49(4):926-31.
82. Paizis G, Tikellis C, Cooper ME, Schembri JM, Lew RA, Smith AI, et al. Chronic liver injury in rats and humans upregulates the novel enzyme angiotensin converting enzyme 2. *Gut*. 2005;54(12):1790-6.
83. Lambert DW, Yarski M, Warner FJ, Thornhill P, Parkin ET, Smith AI, et al. Tumor necrosis factor-alpha convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). *J Biol Chem*. 2005;280(34):30113-9.
84. Wright JW, Harding JW. Importance of the brain Angiotensin system in Parkinson's disease. *Parkinsons Dis*. 2012;2012:860923.
85. Vaajanen A, Kalesnykas G, Vapaatalo H, Uusitalo H. The expression of Mas-receptor of the renin-angiotensin system in the human eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2015;253(7):1053-9.
86. Uddin MN, Nabi AH, Nakagawa T, Ichihara A, Inagami T, Suzuki F. Non-proteolytic activation of prorenin: activation by (pro)renin receptor and its inhibition by a prorenin prosegment, "decoy peptide". *Front Biosci*. 2008;13:745-53.
87. Nguyen G, Delarue F, Berrou J, Rondeau E, Sraer JD. Specific receptor binding of renin on human mesangial cells in culture increases plasminogen activator inhibitor-1 antigen. *Kidney Int*. 1996;50(6):1897-903.
88. Nguyen G, Burckle CA, Sraer JD. Renin/prorenin-receptor biochemistry and functional significance. *Curr Hypertens Rep*. 2004;6(2):129-32.
89. Danser AH, van Kats JP, Admiraal PJ, Derkx FH, Lamers JM, Verdouw PD, et al. Cardiac renin and angiotensins. Uptake from plasma versus in situ synthesis. *Hypertension*. 1994;24(1):37-48.
90. Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzhir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest*. 2002;109(11):1417-27.
91. Kaneshiro Y, Ichihara A, Sakoda M, Takemitsu T, Nabi AH, Uddin MN, et al. Slowly progressive, angiotensin II-independent glomerulosclerosis in human (pro)renin receptor-transgenic rats. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(6):1789-95.

92. Clavreul N, Sansilvestri-Morel P, Magard D, Verbeuren TJ, Rupin A. (Pro)renin promotes fibrosis gene expression in HEK cells through a Nox4-dependent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011;300(6):F1310-8.
93. Li W, Peng H, Cao T, Sato R, McDaniels SJ, Kobori H, et al. Brain-targeted (pro)renin receptor knockdown attenuates angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension*. 2012;59(6):1188-94.
94. Shan Z, Shi P, Cuadra AE, Dong Y, Lamont GJ, Li Q, et al. Involvement of the brain (pro)renin receptor in cardiovascular homeostasis. *Circ Res*. 2010;107(7):934-8.
95. Elton TS, Stephan CC, Taylor GR, Kimball MG, Martin MM, Durand JN, et al. Isolation of two distinct type I angiotensin II receptor genes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;184(2):1067-73.
96. Lenkei Z, Palkovits M, Corvol P, Llorens-Cortes C. Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. *Front Neuroendocrinol*. 1997;18(4):383-439.
97. Hunyady L, Catt KJ. Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol*. 2006;20(5):953-70.
98. Bader M, Ganten D. Update on tissue renin-angiotensin systems. *J Mol Med (Berl)*. 2008;86(6):615-21.
99. Ito M, Oliverio MI, Mannon PJ, Best CF, Maeda N, Smithies O, et al. Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(8):3521-5.
100. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*. 2000;52(3):415-72.
101. Fraune C, Lange S, Krebs C, Holzel A, Baucke J, Divac N, et al. AT1 antagonism and renin inhibition in mice: pivotal role of targeting angiotensin II in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;303(7):F1037-48.
102. Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, Sasamura H, Pratt RE, Dzau VJ. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem*. 1993;268(33):24539-42.
103. Nouet S, Nahmias C. Signal transduction from the angiotensin II AT2 receptor. *Trends Endocrinol Metab*. 2000;11(1):1-6.
104. Bonnet F, Cooper ME, Carey RM, Casley D, Cao Z. Vascular expression of angiotensin type 2 receptor in the adult rat: influence of angiotensin II infusion. *J Hypertens*. 2001;19(6):1075-81.

105. Ozono R, Wang ZQ, Moore AF, Inagami T, Siragy HM, Carey RM. Expression of the subtype 2 angiotensin (AT2) receptor protein in rat kidney. *Hypertension*. 1997;30(5):1238-46.
106. Ohkubo N, Matsubara H, Nozawa Y, Mori Y, Murasawa S, Kijima K, et al. Angiotensin type 2 receptors are reexpressed by cardiac fibroblasts from failing myopathic hamster hearts and inhibit cell growth and fibrillar collagen metabolism. *Circulation*. 1997;96(11):3954-62.
107. Rodrigues-Ferreira S, le Rouzic E, Pawlowski T, Srivastava A, Margottin-Goguet F, Nahmias C. AT2 Receptor-Interacting Proteins ATIPs in the Brain. *Int J Hypertens*. 2013;2013:513047.
108. Premer C, Lamondin C, Mitzey A, Speth RC, Brownfield MS. Immunohistochemical Localization of AT1a, AT1b, and AT2 Angiotensin II Receptor Subtypes in the Rat Adrenal, Pituitary, and Brain with a Perspective Commentary. *Int J Hypertens*. 2013;2013:175428.
109. Suzuki J, Iwai M, Nakagami H, Wu L, Chen R, Sugaya T, et al. Role of angiotensin II-regulated apoptosis through distinct AT1 and AT2 receptors in neointimal formation. *Circulation*. 2002;106(7):847-53.
110. Dimitropoulou C, White RE, Fuchs L, Zhang H, Catravas JD, Carrier GO. Angiotensin II relaxes microvessels via the AT(2) receptor and Ca(2+)-activated K(+) (BK(Ca)) channels. *Hypertension*. 2001;37(2):301-7.
111. Booz GW, Baker KM. Role of type 1 and type 2 angiotensin receptors in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension*. 1996;28(4):635-40.
112. Levy BI, Benessiano J, Henrion D, Caputo L, Heymes C, Duriez M, et al. Chronic blockade of AT2-subtype receptors prevents the effect of angiotensin II on the rat vascular structure. *J Clin Invest*. 1996;98(2):418-25.
113. AbdAlla S, Lothar H, Abdel-tawab AM, Quitterer U. The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem*. 2001;276(43):39721-6.
114. Swanson GN, Hanesworth JM, Sardinia MF, Coleman JK, Wright JW, Hall KL, et al. Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Regul Pept*. 1992;40(3):409-19.
115. Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, Sim P, Clune E, Mustafa T, et al. Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J Biol Chem*. 2001;276(52):48623-6.
116. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev*. 2006;86(3):747-803.

117. Wright JW, Stublely L, Pederson ES, Kramar EA, Hanesworth JM, Harding JW. Contributions of the brain angiotensin IV-AT4 receptor subtype system to spatial learning. *J Neurosci.* 1999;19(10):3952-61.
118. Handa RK, Krebs LT, Harding JW, Handa SE. Angiotensin IV AT4-receptor system in the rat kidney. *Am J Physiol.* 1998;274(2 Pt 2):F290-9.
119. Yang H, Zeng XJ, Wang HX, Zhang LK, Dong XL, Guo S, et al. Angiotensin IV protects against angiotensin II-induced cardiac injury via AT4 receptor. *Peptides.* 2011;32(10):2108-15.
120. Niwa M, Numaguchi Y, Ishii M, Kuwahata T, Kondo M, Shibata R, et al. IRAP deficiency attenuates diet-induced obesity in mice through increased energy expenditure. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;457(1):12-8.
121. Yang R, Walther T, Gembardt F, Smolders I, Vanderheyden P, Albiston AL, et al. Renal vasoconstrictor and pressor responses to angiotensin IV in mice are AT1a-receptor mediated. *J Hypertens.* 2010;28(3):487-94.
122. Becker LK, Etelvino GM, Walther T, Santos RA, Campagnole-Santos MJ. Immunofluorescence localization of the receptor Mas in cardiovascular-related areas of the rat brain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293(3):H1416-24.
123. Zhuo JL, Li XC. New insights and perspectives on intrarenal renin-angiotensin system: focus on intracrine/intracellular angiotensin II. *Peptides.* 2011;32(7):1551-65.
124. Sampaio WO, Nascimento AA, Santos RA. Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1-7) in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284(6):H1985-94.
125. Tallant EA, Ferrario CM, Gallagher PE. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289(4):H1560-6.
126. Fraga-Silva RA, Pinheiro SV, Goncalves AC, Alenina N, Bader M, Santos RA. The antithrombotic effect of angiotensin-(1-7) involves mas-mediated NO release from platelets. *Mol Med.* 2008;14(1-2):28-35.
127. Walters PE, Gaspari TA, Widdop RE. Angiotensin-(1-7) acts as a vasodepressor agent via angiotensin II type 2 receptors in conscious rats. *Hypertension.* 2005;45(5):960-6.
128. Fortes LHS. EFEITO DA OVARIECTOMIA SOBRE O BALANÇO AUTONÔMICO CARDÍACO DE RATAS SUBMETIDAS À DESNUTRIÇÃO PROTEICA 2010.
129. West C, Zhang Z, Ecker G, Masilamani SM. Increased renal alpha-epithelial sodium channel (ENAC) protein and increased ENAC activity in normal pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;299(5):R1326-32.

130. Sharp S, Poglitsch M, Zilla P, Davies NH, Sturrock ED. Pharmacodynamic effects of C-domain-specific ACE inhibitors on the renin-angiotensin system in myocardial infarcted rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2015;16(4):1149-58.
131. Carmona AK, Schwager SL, Juliano MA, Juliano L, Sturrock ED. A continuous fluorescence resonance energy transfer angiotensin I-converting enzyme assay. *Nat Protoc.* 2006;1(4):1971-6.
132. Liu J, Ji H, Zheng W, Wu X, Zhu JJ, Arnold AP, et al. Sex differences in renal angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) activity are 17beta-oestradiol-dependent and sex chromosome-independent. *Biol Sex Differ.* 2010;1(1):6.
133. Matsushima A, Furuuchi R, Shirai M, Nagai S, Yokoyama T, Nishida H, et al. Effects of acute and chronic boysenberry intake on blood pressure and endothelial function in spontaneous hypertensive rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2014;60(1):43-51.
134. Sullivan JC, Pollock DM, Pollock JS. Altered nitric oxide synthase 3 distribution in mesenteric arteries of hypertensive rats. *Hypertension.* 2002;39(2 Pt 2):597-602.
135. McKnight KA, Rupp H, Dhalla KS, Beamish RE, Dhalla NS. Biphasic changes in heart performance with food restriction in rats. *J Appl Physiol (1985).* 1999;87(5):1909-13.
136. Casiero D, Frishman WH. Cardiovascular complications of eating disorders. *Cardiol Rev.* 2006;14(5):227-31.
137. Koschke M, Boettger MK, Macholdt C, Schulz S, Yeragani VK, Voss A, et al. Increased QT variability in patients with anorexia nervosa--an indicator for increased cardiac mortality? *Int J Eat Disord.* 2010;43(8):743-50.
138. Winston AP. The clinical biochemistry of anorexia nervosa. *Ann Clin Biochem.* 2012;49(Pt 2):132-43.
139. Unger T, Paulis L, Sica DA. Therapeutic perspectives in hypertension: novel means for renin-angiotensin-aldosterone system modulation and emerging device-based approaches. *Eur Heart J.* 2011;32(22):2739-47.
140. Mattar L, Huas C, group E, Godart N. Relationship between affective symptoms and malnutrition severity in severe Anorexia Nervosa. *PLoS One.* 2012;7(11):e49380.
141. Duffy M, Jain S, Harrell N, Kothari N, Reddi AS. Albumin and Furosemide Combination for Management of Edema in Nephrotic Syndrome: A Review of Clinical Studies. *Cells.* 2015;4(4):622-30.
142. Skott O, Jensen BL. Cellular and intrarenal control of renin secretion. *Clin Sci (Lond).* 1993;84(1):1-10.

143. Wu KL, Cheng CJ, Sung CC, Tseng MH, Hsu YJ, Yang SS, et al. Identification of the Causes for Chronic Hypokalemia: Importance of Urinary Sodium and Chloride Excretion. *Am J Med.* 2017.
144. Franzoni F, Mataloni E, Femia R, Galetta F. Effect of oral potassium supplementation on QT dispersion in anorexia nervosa. *Acta Paediatr.* 2002;91(6):653-6.
145. Vavruk AM, Martins C, Nascimento MM, Hayashi SY, Riella MC. [Association between hypokalemia, malnutrition and mortality in peritoneal dialysis patients]. *J Bras Nefrol.* 2012;34(4):349-54.
146. Hofmeister LH, Perisic S, Titze J. Tissue sodium storage: evidence for kidney-like extrarenal countercurrent systems? *Pflugers Arch.* 2015;467(3):551-8.
147. Barsony J, Sugimura Y, Verbalis JG. Osteoclast response to low extracellular sodium and the mechanism of hyponatremia-induced bone loss. *J Biol Chem.* 2011;286(12):10864-75.
148. Alshahrani S, Rapoport RM, Soleimani M. Vascular contractile reactivity in hypotension due to reduced renal reabsorption of Na⁺ and restricted dietary Na. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2017;390(3):321-6.
149. Pomeroy C, Eckert E, Hu S, Eiken B, Mentink M, Crosby RD, et al. Role of interleukin-6 and transforming growth factor-beta in anorexia nervosa. *Biol Psychiatry.* 1994;36(12):836-9.
150. Solmi M, Veronese N, Favaro A, Santonastaso P, Manzato E, Sergi G, et al. Inflammatory cytokines and anorexia nervosa: A meta-analysis of cross-sectional and longitudinal studies. *Psychoneuroendocrinology.* 2015;51:237-52.
151. McKinley MJ, Walker LL, Alexiou T, Allen AM, Campbell DJ, Di Nicolantonio R, et al. Osmoregulatory fluid intake but not hypovolemic thirst is intact in mice lacking angiotensin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008;294(5):R1533-43.
152. Xiang L, Clemmer JS, Lu S, Mittweide PN. Impaired blood pressure compensation following hemorrhage in conscious obese Zucker rats. *Life Sci.* 2013;93(5-6):214-9.
153. Ahmad S, Varagic J, VonCannon JL, Groban L, Collawn JF, Dell'Italia LJ, et al. Primacy of cardiac chymase over angiotensin converting enzyme as an angiotensin-(1-12) metabolizing enzyme. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;478(2):559-64.
154. Agarwal D, Welsch MA, Keller JN, Francis J. Chronic exercise modulates RAS components and improves balance between pro- and anti-inflammatory cytokines in the brain of SHR. *Basic Res Cardiol.* 2011;106(6):1069-85.
155. Tikellis C, Johnston CI, Forbes JM, Burns WC, Burrell LM, Risvanis J, et al. Characterization of renal angiotensin-converting enzyme 2 in diabetic nephropathy. *Hypertension.* 2003;41(3):392-7.

156. Zhang S, Morrison JL, Gill A, Rattanatrav L, MacLaughlin SM, Kleemann D, et al. Dietary restriction in the periconceptual period in normal-weight or obese ewes results in increased abundance of angiotensin-converting enzyme (ACE) and angiotensin type 1 receptor (AT1R) in the absence of changes in ACE or AT1R methylation in the adrenal of the offspring. *Reproduction*. 2013;146(5):443-54.
157. Matsubayashi S, Tamai H, Kobayashi N, Takaichi Y, Fukata S, Hirota Y, et al. Angiotensin-converting enzyme and anorexia nervosa. *Horm Metab Res*. 1988;20(12):761-4.
158. Pickering AE, Simms AE, Paton JF. Dominant role of aortic baroreceptors in the cardiac baroreflex of the rat in situ. *Auton Neurosci*. 2008;142(1-2):32-9.
159. Blankestijn PJ, Rupp H. Clinical profile of eprosartan: a different angiotensin II receptor blocker. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2008;6(4):253-7.
160. Zhu H, Tan L, Li Y, Li J, Qiu M, Li L, et al. Increased Apoptosis in the Paraventricular Nucleus Mediated by AT1R/Ras/ERK1/2 Signaling Results in Sympathetic Hyperactivity and Renovascular Hypertension in Rats after Kidney Injury. *Front Physiol*. 2017;8:41.
161. Gomide JM, de Menezes RC, Fernandes LG, Silva FC, Cardoso LM, Miranda PH, et al. Increased activity of the renin-angiotensin and sympathetic nervous systems is required for regulation of the blood pressure in rats fed a low-protein diet. *Exp Physiol*. 2013;98(1):57-66.
162. Gilbert JS, Lang AL, Grant AR, Nijland MJ. Maternal nutrient restriction in sheep: hypertension and decreased nephron number in offspring at 9 months of age. *J Physiol*. 2005;565(Pt 1):137-47.
163. Mizuno O, Tamai H, Fujita M, Kobayashi N, Komaki G, Matsubayashi S, et al. Vascular responses to angiotensin II in anorexia nervosa. *Biol Psychiatry*. 1993;34(6):401-6.
164. Mederle K, Schweda F, Kattler V, Doblinger E, Miyata K, Hoehrl K, et al. The angiotensin II AT1 receptor-associated protein Arap1 is involved in sepsis-induced hypotension. *Crit Care*. 2013;17(4):R130.
165. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000;87(10):840-4.
166. Santos RA, Ferreira AJ, Verano-Braga T, Bader M. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *J Endocrinol*. 2013;216(2):R1-R17.
167. Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept*. 2000;91(1-3):45-62.

168. Sasaki S, Higashi Y, Nakagawa K, Matsuura H, Kajiyama G, Oshima T. Effects of angiotensin-(1-7) on forearm circulation in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Hypertension*. 2001;38(1):90-4.
169. Davie AP, McMurray JJ. Effect of angiotensin-(1-7) and bradykinin in patients with heart failure treated with an ACE inhibitor. *Hypertension*. 1999;34(3):457-60.
170. Iyer SN, Averill DB, Chappell MC, Yamada K, Allred AJ, Ferrario CM. Contribution of angiotensin-(1-7) to blood pressure regulation in salt-depleted hypertensive rats. *Hypertension*. 2000;36(3):417-22.
171. Tigerstedt, R. and Bergman, P. Niere und Kreislauf. *Arch. Physiol*. 1898; **8**: 223–271.