

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

Influência da restrição alimentar no controle da pressão arterial sistêmica

Aluna: Aline Maria Arlindo de Souza

Ouro Preto

2013

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

Influência da restrição alimentar no controle da pressão arterial sistêmica

ALUNA: Aline Maria Arlindo de Souza

ORIENTADOR: Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Jr

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes

Dissertação 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 Mestre, em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

Ouro Preto

2013

S729i Souza, Aline Maria Arlindo de.
Influência da restrição alimentar no controle da pressão arterial sistêmica
[manuscrito] / Aline Maria Arlindo de Souza - 2013.
89f.: il. color.; graf., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Júnior.
Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências
Biológicas.
Área de concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Anorexia - Teses. 2. Sistema cardiovascular - Reflexos cardiovasculares -
Teses. 3. Sistema renina-angiotensina - Teses. I. Chianca Júnior, Deoclécio
Alves. II. Menezes, Rodrigo Cunha Alvim de. III. Universidade Federal de Ouro
Preto. IV. Título.

CDU: 612.395.6:616.12-008.33

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

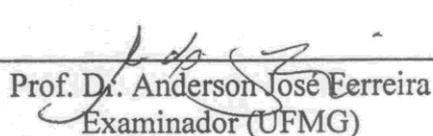
“Influência da restrição alimentar no controle da pressão arterial”

Aos vinte e oito dias do mês de Fevereiro de 2013, às 13:30, na Sala Multimídia do ICEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Aline Maria Arlindo de Souza**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pelo candidato 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.

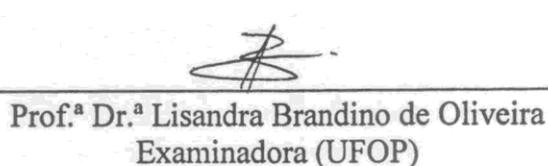
Membros da Banca Examinadora:



Prof. Dr. Deoclécio Alves Chiança Júnior
Presidente



Prof. Dr. Anderson José Ferreira
Examinador (UFMG)



Prof.ª Dr.ª Lisandra Brandino de Oliveira
Examinadora (UFOP)

DATA DA DEFESA: 28/02/2013

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Fisiologia Cardiovascular** e no **Laboratório de Bioquímica Metabólica** ambos do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, com auxílio da CAPES, CNPq, FAPEMIG e UFOP.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço meu orientador, Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Jr, pela oportunidade, por acreditar em mim, pelos ensinamentos e por ter muita paciência comigo;

Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes pelas discussões e ensinamento;

Meus pais, Miria e Admir, por acreditarem que a educação faz a diferença e assim me incentivam a continuar meus estudos. Serei eternamente grata!

Minha irmã Ariane pela paciência, convivência e apoio;

Tiago pelo companheirismo, cumplicidade, sempre comigo nas melhores e piores horas, nas ideias e discussões que sempre me fazem pensar e aprender;

Minhas queridas fiéis companheiras de labuta, Aline Rezende, Laura Batista, Alessandra Rezende, vocês fizeram toda a diferença.

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;

Prof^a Dr^a Daniela Caldeira Costa pela disponibilidade e atenção;

Prof. Dr. Pesquero e a Dr. Mércia do laboratório de Biofísica do ICB da UFMG, pela atenção oferecida.

Aos Laboratórios do NUPEB e seus professores responsáveis, LIMP – Prof^a. Dr^a. Cláudia Carneiro e LABNEX - Prof. Dr. Marcelo Eustáquio da Silva que foram indispensáveis na execução desse trabalho.

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

Aos funcionários do LFC e NUPEB que sempre estavam dispostos a me auxiliar quando requisitados e com muita dedicação.

Assim, sou grata a todos. Muito Obrigada!!!

SUMÁRIO

Introdução	6
Restrição alimentar	6
Reflexos cardiovasculares	7
Sistemas de controle da pressão arterial	11
Objetivos	16
Objetivo geral.....	16
Objetivos específicos	16
Materiais e métodos	17
Modelo animal.....	17
Restrição alimentar	17
Estimativa da ingestão alimentar	18
Preparo de drogas e soluções	18
Confecção dos materiais utilizados.....	21
Cirurgias.....	21
Cuidados pós-operatórios	23
Registros e análises da pressão arterial média e frequência cardíaca	24
Procedimentos das Microinjeções.....	29
Análise da microinjeção por avaliação histológica	29
Pesagem dos órgãos	30
Dosagem de Angiotensina II por radioimunoensaio.....	31
Dosagem de óxido nítrico plasmático	32
Determinação dos parâmetros bioquímicos.....	34
Avaliação do ciclo estral.....	35
Análises estatísticas.....	36
Resultados	36

Discussão	59
Conclusão	70
Referências bibliográficas	71

Lista de figuras

- Figura 1: Barorreflexo e reflexo Bezold-Jarisch (Guyton, 2006). Adaptado. Em azul identificação da localização dos receptores cardiopulmonares e em vermelho a localização dos receptores do reflexo barorreceptor. 9
- Figura 2: Quimiorreceptores periféricos e Bifurcação Carotídea: (CC= Corpúsculo Carotídeo; SC= Seio Carotídeo; AA= Arco Aórtico) (Penitente, 2006). 10
- Figura 3: *Organização do corpúsculo carotídeo; células do tipo I (1A) e células do tipo II (1B)* (Krammer, 1978). 11
- Figura 4: Esquema do sistema renina angiotensina (Unger e cols., 2011; Santos e cols., 2000). Adaptado. Ang: Angiotensina, NEP: endopeptidase neutra, PEP:prolilendopeptidase, ECA: enzima conversora de angiotensina, AMPA: aminopeptidase A, AMPN: Aminopeptidase N, AMPD: aminopeptidase D..... 14
- Figura 5: Esquema simplificado da canulação da artéria (vermelho) e da veia (azul) femoral..... 23
- Figura 6: Linha temporal representativa da infusão de drogas para testar óxido nítrico plasmático. 24
- Figura 7: Linha temporal representativa da infusão de drogas para testar os reflexos cardiovasculares..... 26
- Figura 8: Linha temporal representativa da infusão de drogas para testar os receptores α_1 (A) e β adrenérgicos (B)..... 27
- Figura 9: Linha do tempo representativa da infusão de drogas endovenosa para testar Ang I, ECA e bradicinina..... 28
- Figura 10: Linha do tempo representativa da infusão de drogas endovenosa (B e D) e icv (A e C) para testar os receptores de angiotensina II..... 29
- Figura 11: Fotomicrografia do corte histológico confirmando o local de microinjeção no ventrículo lateral (seta preta) de um animal com restrição alimentar..... 30
- Figura 12: Ingestão alimentar estimada e acompanhamento do peso corporal. Quantificação do consumo médio diário de ração pelo grupo controle para posterior cálculo da quantidade de ração oferecida ao grupo RA, n=18 (A) e acompanhamento do peso corporal dos animais controle e submetido à restrição alimentar durante 14 dias, n=18 (B). * Diferença estatística entre controle e RA; ANOVA two way, com pós-teste de Bonferroni ($p<0,05$). 37
- Figura 13: Ciclo estral. Avaliação diária do ciclo estral por esfregaço vaginal a fresco em animais controle e submetidos à restrição alimentar, n=18. -- Diferença estatística entre controle e RA; ANOVA two way, com pós-teste de Bonferroni ($p<0,05$). 38

Figura 14: Pressão arterial média (A) e frequência cardíaca (B) em animais submetidos à restrição alimentar. *Diferença estatística entre controle e RA; Teste t de <i>Student</i> não pareado ($p < 0,05$).	42
Figura 15: Óxido nítrico plasmático. Efeito da restrição alimentar nas concentrações plasmáticas de óxido nítrico. *Diferença estatística entre controle e RA; Teste t de <i>Student</i> não pareado ($p < 0,05$).	43
Figura 16: Bloqueio da enzima óxido nítrico sintase. Efeito da infusão de L-NAME na pressão arterial (A) e frequência cardíaca (B) nos animais submetidos à restrição alimentar. Os gráficos C e D são, respectivamente, a variação da pressão arterial e frequência cardíaca no decorrer do tempo, e os gráficos E e F, a comparação do delta da PAM e FC em determinados tempos. Teste t de <i>Student</i> não pareado para comparações entre dois deltas, Anova one way para mais de dois deltas e Anova two way para comparação das curvas ($p < 0,05$).	44
Figura 17: Quimiorreflexo. Efeito da estimulação com KCN do quimiorreflexo na pressão arterial (A) e frequência cardíaca (B) em animais submetidos à restrição alimentar. Teste t de <i>Student</i> não pareado ($p < 0,05$).	45
Figura 18: Reflexo Bezold-Jarisch. Alteração da pressão arterial (A) e frequência cardíaca (B) após estimulação do reflexo Bezold-Jarisch com fenilbiguanida em animais submetidos à restrição alimentar. * Diferença estatística entre controle e RA; Teste t de <i>Student</i> não pareado ($p < 0,05$).	46
Figura 19: Barorreflexo: Estimulação do barorreflexo com fenilefrina e nitroprussiato de sódio em animais submetidos à restrição alimentar. Gráficos de A a E são componentes da curva da função (F) e o gráfico (G) é exemplificação do ganho. Teste t de <i>Student</i> não pareado ($p < 0,05$).	48
Figura 20: Receptores α_1 adrenérgico. Alterações na pressão arterial (A) e frequência cardíaca (B) após bloqueio dos receptores α_1 adrenérgicos com prazosin em ratos submetidos à restrição alimentar. * Diferença estatística entre controle e RA; Teste t de <i>Student</i> não pareado ($p < 0,05$).	49
Figura 21: Receptores β adrenérgicos: Variação da pressão arterial (A) e frequência cardíaca (B) após bloqueio dos receptores β adrenérgicos com infusão de propranolol em animais submetidos à restrição alimentar. *Diferença estatística entre controle e RA; Teste t de <i>Student</i> não pareado ($p < 0,05$).	49
Figura 22: Bradicininina e angiotensina I. Alterações na pressão arterial e frequência cardíaca após infusão endovenosa de diferentes concentrações de bradicininina (A e B) e angiotensina I (C e D) em ratos submetidos à restrição alimentar. *Diferente do controle na mesma concentração; # Diferente da concentração anterior no mesmo grupo. Teste t de <i>Student</i> , não pareado ($p < 0,05$).	51
Figura 23: Bloqueio da ECA. Efeito da infusão endovenosa de captopril na pressão arterial (A) e frequência cardíaca (B) de ratos submetidos à restrição alimentar. Teste t de <i>Student</i> não pareado ($p < 0,05$).	51

Figura 24: Efeito do captopril na resposta à bradicinina e angiotensina I. Comparação da variação da pressão arterial e frequência cardíaca causada pela bradicinina (A e B) e angiotensina I (C e D) antes e após infusão de captopril. *Diferente do controle no mesmo tempo. #Diferente do mesmo grupo. Teste t de <i>Student</i> , não pareado ($p < 0,05$).	53
Figura 25: Angiotensina II. Alteração na pressão arterial e frequência cardíaca após infusão endovenosa (A e B) e microinjeção intracerebroventricular (C e D) de angiotensina II em ratas submetidas à restrição alimentar. * Diferença estatística entre controle e RA; Teste t de <i>Student</i> não pareado ($p < 0,05$).	54
Figura 26: Curva da ação da angiotensina II. Análise do perfil da resposta pressora e bradicardica após infusão endovenosa e microinjeção intracerebroventricular de angiotensina II em ratas submetidas à restrição alimentar. * Diferença estatística entre controle e RA no tempo determinado; ANOVA two way, com pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).	55
Figura 27: Angiotensina II. Dosagem da angiotensina II plasmática em ratas submetidas à restrição alimentar. Teste t de <i>Student</i> , não pareado, ($p < 0,05$).	56
Figura 28: Receptores AT1. Variação da PAM e FC após bloqueio dos receptores AT1 periféricos (A e B) e centrais (C e D) com losartan em ratas submetidas à restrição alimentar. *Diferença estatística entre controle e RA; Teste t de <i>Student</i> , não pareado, ($p < 0,05$).	57
Figura 29: Perfil da resposta após bloqueio dos receptores AT1. Gráficos referentes às variações da pressão arterial e frequência cardíaca no decorrer do registro após infusão endovenosa (A e B) e microinjeção intracerebroventricular (C e D) de losartan em ratas submetidas à restrição alimentar.* Diferença estatística entre controle e RA no tempo determinado; ANOVA two way com pós-teste de Bonferroni, ($p < 0,05$).	58
Figura 30: Esquema dos resultados obtidos em ratas submetidas à restrição alimentar. (PA: pressão arterial, DC: débito cardíaco, RPT: resistência periférica total).	70

Lista de tabelas

Tabela 1: Efeitos da dieta (controle e restrição alimentar) sobre os parâmetros bioquímicos.....	39
Tabela 2: Peso úmido absoluto dos órgãos.....	40
Tabela 3: Peso úmido relativo dos órgãos / 100g peso corporal.....	40
Tabela 4: Peso seco absoluto dos órgãos.....	41
Tabela 5: Peso seco relativo dos órgãos / 100g peso corporal.....	41

Lista de abreviaturas

ALT	Alanina aminotransferase
AMPA	Aminopectidase A
AMPD	Aminopectidase D
AMPN	Aminopectidase N
AN	Anorexia nervosa central
Ang	Angiotensina
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BK	Bradicinina
CVLM	Bulbo ventrolateral caudal
ECA	Enzima conversora de angiotensina
FC	Frequência cardíaca
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
ICV	Intracerebroventricular
IV	Intravenoso
LH	Hormônio luteinizante
NEP	Endopeptidase neutra
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NTS	Núcleo do trato solitário
PA	Pressão arterial
PAM	Pressão arterial média
PEP	Proil endopeptidase

RA	Restrição alimentar
RVLM	Bulbo ventrolateral rostral
RVMM	Bulbo ventromedial rostral
SCC	Sistema cinina caliceína
SNA	Sistema nervo autônomo
SNC	Sistema nervoso central
SNS	Sistema nervosa simpático
SRA	Sistema renina angiotensina

Resumo

Anorexia nervosa é caracterizada por alterações psicológicas que ocasionam uma distorção da imagem corporal, um medo extremo de engordar e uma redução voluntária na ingestão alimentar. Esses pacientes muitas vezes desenvolvem alterações cardiovasculares, as quais são consideradas a principal causa de morte. Na impossibilidade de desenvolver experimentos com humanos, modelos experimentais que apresentam alterações semelhantes à anorexia tornam-se necessários para uma melhor compreensão da patologia.

O modelo de restrição alimentar (RA) utilizado consiste na redução de 60% da quantidade de micro e macronutrientes oferecidos durante 14 dias. No 14º dia o grupo controle e RA foram subdivididos em três grupos experimentais: central, periférico e dosagens bioquímicas. Após o período de dieta, observamos que a mesma diminuiu o peso corporal dos animais e gerou alterações bioquímicas e fisiológicas semelhantes as que ocorrem na anorexia. As alterações bioquímicas foram diminuição da albumina plasmática, colesterol total e LDL, AST e ureia, juntamente com aumento na concentração de glicose e creatinina. Já as alterações fisiológicas foram anastro, diminuição da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC). Também observamos edema cerebral e pulmonar e diminuição no peso do coração, rim e fígado, segundo peso absoluto. Posteriormente, testamos os sistemas que controlam a pressão arterial e a RA diminuiu o óxido nítrico plasmático e ocasionou uma resposta hipotensora maior após estimulação periférica do reflexo Bezold-Jarisch. Esse mesmo perfil de resposta foi observado após inibição periférica dos receptores α_1 adrenérgico, porém quando bloqueamos os receptores β adrenérgicos houve uma resposta pressora menor. A infusão de Ang I aumentou mais a PAM nos animais RA, a qual posteriormente foi abolida pelo captopril. Quando colocamos Ang II por via endovenosa ou intracerebroventricular a resposta pressora foi menor na restrição em ambas as vias de administração. No bloqueio dos receptores AT1 centrais houve uma hipotensão mais acentuada que não foi observada no teste periférico e após dosagem da concentração de Ang II plasmática não houve diferença.

Contudo, podemos dizer que o protocolo de restrição alimentar foi eficiente em desenvolver alterações bioquímicas e fisiológicas semelhantes as da anorexia nervosa diminuiu a concentração de óxido nítrico plasmático, aumentou a atividade simpática no vaso e aumentou a resposta hipotensora do reflexo Bezold-Jarisch. No sistema renina angiotensina, ocorreu uma resposta pressora reduzida após infusão de Ang II nos animais submetidos à restrição alimentar, também houve um aumento da responsividade após infusão de angiotensina I dependente de ECA juntamente com um aumento da atividade do receptor AT1.

Abstract

Anorexia nervosa is characterized by psychological changes that cause a distortion of body image, extreme fear of gaining weight and voluntary reduction in food intake. These patients often develop cardiovascular changes, which are considered the leading cause of death. Failing to develop human experiments, experimental models showing changes similar to anorexia become necessary for a better understanding of the pathology.

The model of food restriction (FR) used was the restriction of 60% including macro and micro nutrients during 14 days. After the diet period, the control group and FR were divided in three experimental groups: central, peripheral and biochemical measurements. 14 days food restriction decreased body weight of the rats and produced biochemical and physiological changes that simulated anorexia nervosa symptoms. The biochemical alterations observed were reduction in plasma albumin, total cholesterol, LDL cholesterol, AST and urea. At the same time, there were increases in plasmatic concentrations of glucose and creatinine. The physiological changes observed were anestrus, hypotension and bradycardia. We have also detected cerebral and lung edema with reduction in heart, kidney and liver weight. Subsequently, we tested the systems that control blood pressure. Plasma nitric oxide was reduced in FR rats. FR rats presented a greater hypotensive response after peripheral stimulation of the Bezold-Jarisch reflex and inhibition of peripheral α_1 adrenergic receptors. After blockage of β -adrenergic receptors there was a smaller pressor response in FR rats. The infusion of iv. Ang I increased blood pressure in FR, which was abolished by iv captopril. The pressor response was induced by iv and icv AngII was lower in food restricted animals. After the central blockage of AT1 receptors, in periventricular areas of lateral ventricle, there was a more pronounced hypotension which was not observed after the peripheral infusion. Interestingly, the plasma concentration of Ang II was not different between control and FR.

Thus, we can conclude that food restriction protocol was effective in developing biochemical and physiological changes similar to those observed in anorexia nervosa in humans. Food restriction decreased plasma nitric oxide

concentration, increased sympathetic activity in the vessel and increased the hypotensive response of Bezold-Jarisch reflex. In the renin-angiotensin system, there was a reduced pressor response after infusion of Ang II in animals subjected to dietary restriction. On the other hand, the pressor response of Ang I was increased and dependent on ECA. A possible increase in AT1 receptor activity could be prevent in the model contributing, with the increased sympathetic activity, in maintenance of blood pressure in FR rats.

INTRODUÇÃO

RESTRICÇÃO ALIMENTAR

Anorexia segundo seu significado etimológico descrito por Cunha (1982) é uma palavra de origem grega – an, deficiência ou ausência de, e orexis, apetite -, ou seja, perda ou ausência de apetite. Contudo, nas definições mais recentes encontradas em dicionários como o Novo Dicionário da Língua Portuguesa Aurélio, além de ser a “perda ou diminuição acentuada de apetite”, também recebe o conceito de “distúrbio mental que se manifesta na recusa de alimentação”.

A anorexia foi descrita clinicamente pela primeira vez no século XVII. A partir dessa época até meados de 1900 o ato de ingerir alimentos em quantidade insuficiente tinha um objetivo diferente dos que observamos hoje em dia. Na mitologia grega e nas passagens bíblicas, o ato de não comer era a aproximação do ser humano com os deuses ou comportamentos relacionados à bruxaria, sendo predominantemente realizados por mulheres (Bidaud, 1998). Já nas tradições orientais e egípcias o jejum era realizado para combater a ação maléfica de demônios. Existem ainda relatos de pessoas que faziam da privação de alimentos uma atitude de rebeldia contra uma sociedade patriarcal (Pewzner-Apeloig, 2001).

Atualmente com a globalização e o capitalismo cada vez mais imposto, a mídia torna-se um meio de comunicação imprescindível. Mas juntamente com toda essa necessidade de divulgação de notícias e propagandas, ocorre uma apologia à magreza, considerando-a como o padrão de beleza moderno. Assim muitas pessoas se sentem pressionadas para conquistar esse ideal de beleza e, por este conceito, acabam por aderirem dietas rigorosas, com baixa quantidade de calorias e nutrientes, ignorando o próprio apetite. Quando se percebe, um quadro patológico de anorexia nervosa (AN) já está instalado.

Segundo a Organização Mundial da Saúde a AN é definida como a perda de peso voluntária e/ou sustentada pelo paciente. Para detecção da patologia alguns itens são avaliados: peso 15% abaixo do ideal, amenorreia, alterações na

concentração de cortisol circulante e anormalidades na secreção de insulina (WHO, 2007; CID – 10). Essa patologia ocorre principalmente em meninas adolescentes e mulheres jovens, mas pode ocorrer em outras idades e com homens, mas em menor frequência. A ausência de uma alimentação adequada ocasiona alterações orgânicas que levam a morbi-mortalidade nesses indivíduos. Estudos demonstram que pessoas com anorexia nervosa desenvolvem várias alterações cardiovasculares como hipotensão, bradicardia, anormalidades na válvula mitral, hipotrofia ventricular esquerda, disfunção sistólica (De e cols., 1994) e prolongamento do intervalo QT (Casiero & Frishman, 2006; Vazquez e cols., 2003).

Como alguns métodos experimentais são impossíveis de realizar com humanos, por serem muito invasivos, o desenvolvimento e a utilização de modelos animais experimentais com alterações semelhantes à patologia estudada tornam-se necessários. Um modelo para estudo de AN muito utilizado e reconhecido pela literatura é a Restrição Alimentar (RA) (Hagan e cols., 2002; Siegfried e cols., 2003). Estudos demonstram que ratas submetidas à RA desenvolvem alterações semelhantes à AN, como hipotensão, bradicardia, diminuição da contração cardíaca (+dP/dt) e diminuição do relaxamento do ventrículo esquerdo (-dP/dt), (Hilderman e cols., 1996; Pinotti e cols., 2010).

REFLEXOS CARDIOVASCULARES

Existem diversos mecanismos utilizados pelo organismo para controlar a pressão arterial (PA) momento-a-momento como, por exemplo, o reflexo cardiopulmonar Bezold-Jarisch, o quimiorreflexo e o reflexo barorreceptor. O reflexo Bezold-Jarisch foi descoberto em 1867 por Von Bezold e Hirt em um experimento com a infusão endovenosa do extrato das plantas alcaloides *Veratrum viride* e *Viscum album*. Após a infusão dessas substâncias, Bezold observou uma resposta reflexa, considerada clássica, que consistia na tríade bradicardia, hipotensão e apnéia (Kramer, 1961). Além da estimulação por produtos alcaloides, esse reflexo também pode ser estimulado por capsaicina, serotonina ou fenilbiguanida, (Higuchi e cols., 1988; Thoren, 1979; Ustinova & Schultz, 1994). Outra forma de estimular esse

reflexo é por meio da estimulação dos mecanorreceptores localizados nas câmaras cardíacas e no pulmão. Após a ativação desses receptores a resposta trafega através de fibras aferentes, via nervo vago, que chega ao sistema nervoso central (SNC). Ainda não se sabe quais vias neuronais estão realmente envolvidas na resposta do reflexo cardiopulmonar, porém estudos relatam que esse reflexo possui vias similares ao barorreflexo (Verberne & Guyenet, 1992). Essas vias incluem sinapses na região do núcleo do trato solitário (NTS), caudal ventrolateral (CVLM), rostro ventrolateral do bulbo (RVLM) e núcleo ambíguo, com simpato-inibição e ativação parassimpática nos vasos e no coração (Mais'kyi e cols., 2005) (figura 1).

Outro reflexo que controla a PA em curto prazo é o barorreflexo. Nesse reflexo os receptores localizam-se no arco aórtico e seio carotídeo detectam mudanças na PA através de alterações mecânicas com posterior ajuste da frequência cardíaca (FC) e do tônus simpático vascular (Sagawa, 1983). Essa resposta de ajuste ocorre da seguinte forma: as aferências barorreflexas chegam ao NTS, projetam através de neurônios de segunda ordem para a região caudal ventrolateral do bulbo (CVLM) onde fazem sinapses com neurônios inibitórios, estes por sua vez projetam para a RVLM gerando uma resposta simpatoexcitatória. Em paralelo, os neurônios de segunda ordem mantem uma influência excitatória sobre os neurônios parassimpáticos pré-ganglionares localizados no núcleo dorsal do vago, rostral ventromedial do bulbo (RVMM) e principalmente no núcleo ambíguo. Ou seja, esse sistema modula tanto a atividade vagal quanto simpática e como consequência modifica a frequência cardíaca, contratilidade cardíaca e resistência vascular periférica (Vasquez e cols., 1997) (figura 1).

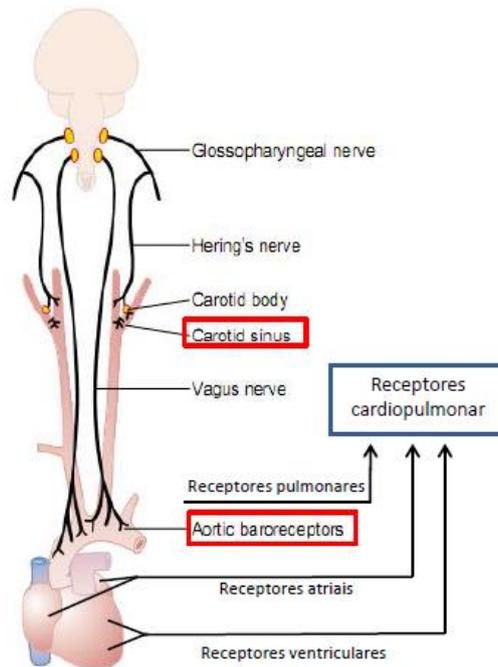


Figura 1: Barorreflexo e reflexo Bezold-Jarisch (Guyton, 2006). Adaptado. Em azul identificação da localização dos receptores cardiopulmonares e em vermelho a localização dos receptores do reflexo barorreceptor.

Alterações na concentração de oxigênio, gás carbônico ou pH sanguíneo necessitam de uma resposta rápida para o retorno da homeostasia, pois caso essas alterações permaneçam por muito tempo seria impossível o organismo manter-se vivo. Um sistema existente no corpo humano que mantém a oxigenação adequada é o quimiorreflexo. Através da regulação da concentração dos gases circulantes, esse reflexo acaba controlando a PA em curto prazo (Somers e cols., 1989). O quimiorreflexo possui receptores quimiossensíveis no corpúsculo carotídeo e na bifurcação da carótida que geram uma resposta de vasoconstrição periférica e bradicardia (HEYMANS, 1958) (figura 2).

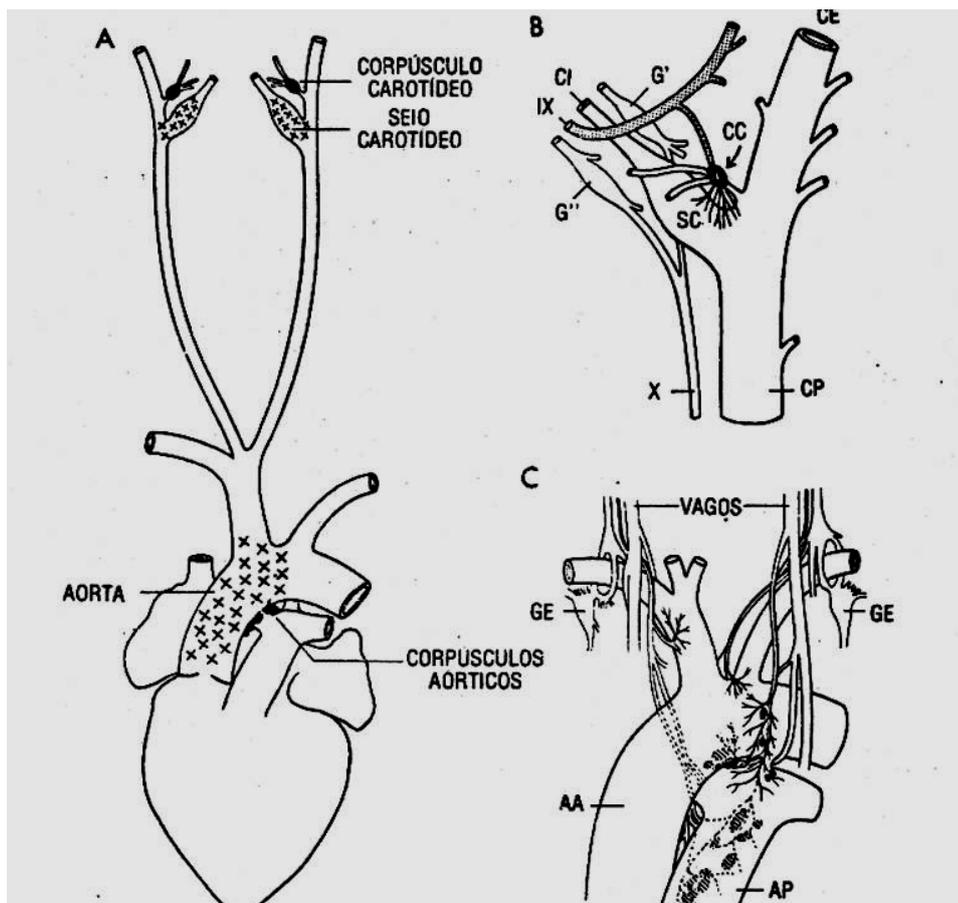


Figura 2: Quimiorreceptores periféricos e Bifurcação Carotídea: (CC= Corpúsculo Carotídeo; SC= Seio Carotídeo; AA= Arco Aórtico) (Penitente, 2006).

O corpúsculo carotídeo é formado por células secretórias, como neurônios, chamadas do tipo 1 (1A) ou de células glomais que são cercadas por células do tipo gliais, chamadas de tipo 2 (1B) ou células de sustentação (McDonald, 1975) (figura 3). Ainda não está bem estabelecido, porém aceita, que células glomais juntamente com suas terminações nervosas e corpos celulares pós-ganglionares, compreendem uma unidade quimiossensitiva e são o primeiro sítio de detecção das alterações da concentração de íons H^+ , PCO_2 e PO_2 (Carroll & Kim, 2012). As células glomais realizam uma sinapse com o SNC, e evidências sugerem que ATP, adenosina e acetilcolina agem como neurotransmissores excitatórios que causam uma despolarização nas terminações nervosas e geram um pico de atividade no SNC (Carroll & Kim, 2012; Krammer, 1978). Assim que as células glomais enviam sinais para o SNC, na região do bulbo, ocorre aumento da ventilação, da atividade

simpática periférica e da atividade vagal no coração. Essas alterações têm como função manutenção das trocas gasosas e manutenção da perfusão em órgãos vitais como o coração e cérebro (Sapru, 1996).

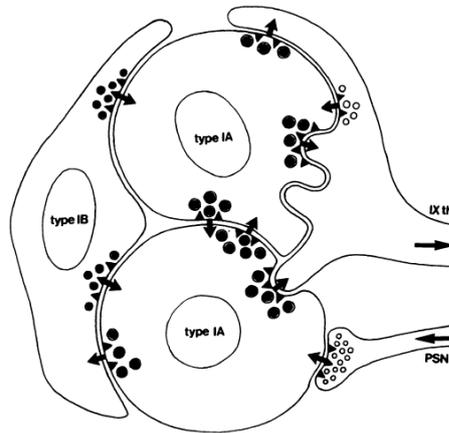


Figura 3: Organização do corpúsculo carotídeo; células do tipo I (1A) e células do tipo II (1B) (Krammer, 1978).

SISTEMAS DE CONTROLE DA PRESSÃO ARTERIAL

O corpo passa por diversas alterações internas ou externas (variações ambientais) e isso requer sistemas que mantenham a estabilidade do organismo. Esses sistemas devem atuar na regulação cardiovascular, metabólica e imunológica além de ser termoregulador. Esse sistema é o SNA, onde um grupo de neurônios mantém a homeostase do organismo e efetua as respostas de adaptações necessárias diante das alterações do meio externo e interno (Cannon, 1929). Ele composto por uma parte central com centros de integração e neurônios pré-ganglionares e uma parte periférica que contém fibras eferentes viscerais, gânglios sensitivos, fibras pré-ganglionares, gânglios simpático e parassimpático e fibras pós-ganglionares. Os nervos onde as aferências localizam-se na região crânio-sacral constituem o sistema nervoso parassimpático e os que saem da região torácica e lombar constituem o sistema nervoso simpático (SNS) (Freire-Maia, 1990; Guyenet,

2006). Na maioria das condições fisiológicas ocorre um equilíbrio de atividade entre o simpático e parassimpático, chamado de balanço autonômico (Janig & McLachlan, 1992).

O sistema nervoso simpático altera o sistema cardiovascular através da ação de neurotransmissores ou hormônios como noradrenalina ou adrenalina que ativam receptores adrenérgicos localizados nos vasos sanguíneos, no coração, nos rins e adrenais. Em 1948, Ahlquist notou que vários agonistas simpatomiméticos geravam dois padrões de respostas (excitatórias e inibitórias) que causavam respostas farmacológicas em uma série de órgãos. Assim ele propôs a divisão dos adrenoreceptores em dois tipos, α (para excitatório) e β (para inibitório) (Guimaraes & Moura, 2001).

Os receptores α intercedem as ações das catecolaminas circulantes e estão presentes em diversos tecidos como cérebro, coração, vasos sanguíneos, fígado, pulmão, próstata e baço. Nesses tecidos após a estimulação dos receptores α_1 adrenérgico há contração do músculo liso, com exceção do trato gastrointestinal onde ocorre dilatação muscular, diminuição da secreção de insulina e dilatação da íris (Ahlquist, 1979; Ahlquist, 1980).

Em condições fisiológicas as catecolaminas também induzem uma resposta inotrópica positiva, cronotrópica e lusitrópica (relaxamento) no coração através dos receptores β_1 , considerando que este é o receptor em maior concentração no coração. O receptor adrenérgico β_2 também está presente em cardiomiócitos, porém em pouquíssimas quantidades, sua concentração e efeito são mais pronunciados em músculo liso vascular gerando vasodilatação (Ahlquist, 1979). O receptor β_3 adrenérgico possui efeito na ativação da termogênese, lipólise no tecido adiposo e regulação das propriedades fisiológicas do trato gastrointestinal (Steinberg, 1999).

Além desses mecanismos que controlam a pressão arterial em um curto período de tempo também são necessários vias de controle em longo prazo, sendo uma delas o sistema renina angiotensina aldosterona. Esse sistema foi descoberto a mais de 100 anos pelo estudo de um agente que era produzido pelo rim, chamado de renina (Cleland & Reid, 1996). Quando ocorre uma queda da pressão arterial há síntese e liberação na corrente sanguínea de renina pelas células justaglomerulares. A renina por sua vez atua sobre o angiotensinogênio formando a angiotensina I

(Ang I) que por ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) (principalmente nos pulmões) cliva a Ang I em angiotensina II (Ang II). A Ang II desenvolve a principal via da manutenção da homeostase cardiovascular através dos receptores AT1 e AT2 (Zhuo & Li, 2011a). Atualmente sabe-se que essa via é muito mais complexa, com atuação dupla no sistema vasotativo, uma via endócrina e uma via parácrina tecidual, presente no rim, glândulas adrenais, coração, vasos sanguíneos, fígado, cérebro e tecido adiposo, entre outros (Zhuo & Li, 2011b). As respostas desencadeadas após ativação dos receptores são crescimento celular, proliferação e controle da formação da matriz extracelular, além da regulação da pressão arterial, concentração de eletrólitos, ingestão hídrica, secreção de hormônios e função renal (de e cols., 2000). Outra angiotensina existente nesse sistema é a Angiotensina III (Ang III). Esta por sua vez é formada pela ação da aminopeptidase A (AMPA) a partir de Ang II e possui afinidade tanto para o receptor AT1 quanto para o AT2. Após ativar os receptores AT1 ou AT2 as respostas geradas serão as respostas clássicas decorrentes da ativação desses receptores, produção de aldosterona, vasoconstrição ou vasodilatação, ações pró ou anti-inflamatórias. Outra angiotensina é a Angiotensina IV (Ang IV) que é formada a partir da Ang III por ação de aminopeptidase N (AMPN) e diretamente da Ang II pela ação da enzima D-aminopeptidase e atua nos receptores AT4 ou AT1, promovendo vasoconstrição, melhora no aprendizado e memória (Nguyen Dinh & Touyz, 2011) (figura 4).

Em 1988, Santos et al descrevem a formação de um dos metabólitos do SRA o heptapeptídeo, angiotensina Ang-(1-7). Primeiramente observaram que sua formação ocorria pela conversão da Ang I através de endopeptidases e carboxipeptidases (Santos e cols., 1988). Hoje se sabe que além dessa via, a Ang-(1-7) também pode ser metabolizada diretamente pela clivagem da AngII através da ação da ECA2. Através da utilização de antagonistas seletivos da Ang-(1-7), estudos demonstraram que esse peptídeo não se liga nos receptores AT1 e AT2, e sim no receptor Mas (Santos e cols., 2006; Santos e cols., 2003).

A renina é considerada uma enzima sem função biológica além da produção de Ang I. Porém, recentemente estudos demonstram que pró-renina e renina ligam a receptores específicos. A ativação desses receptores promove crescimento celular, fibrose em cardiomiócitos e células endoteliais e anti-apoptose (Nguyen, 2011).

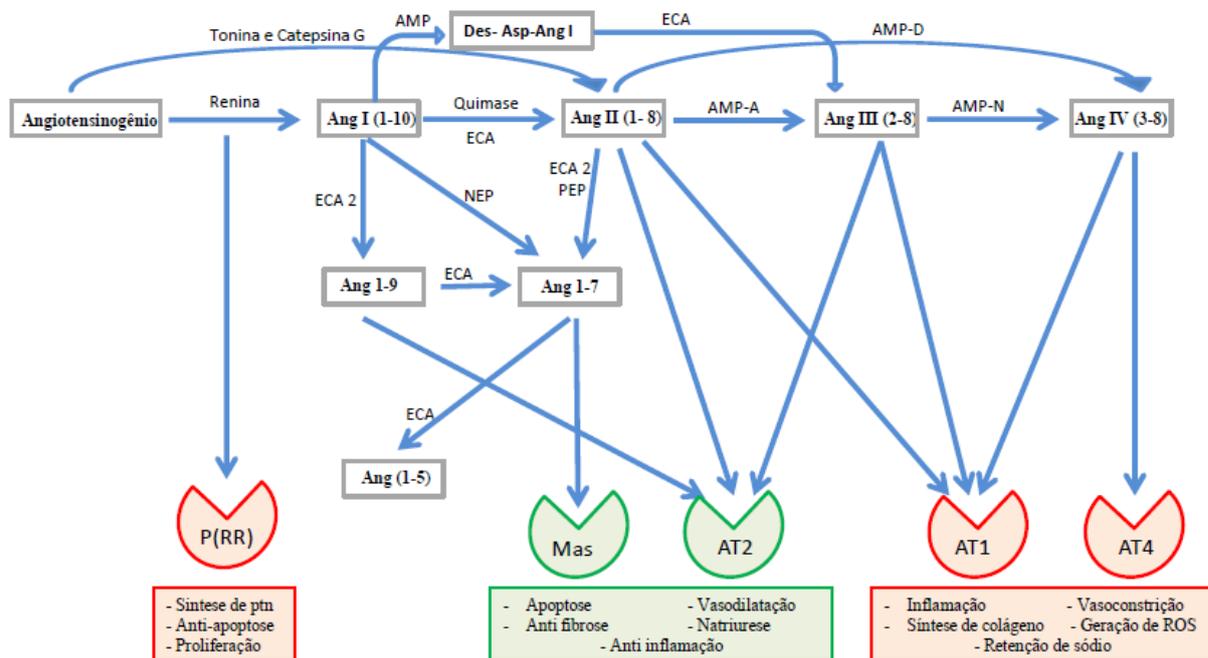


Figura 4: Esquema do sistema renina angiotensina (Unger e cols., 2011; Santos e cols., 2000). Adaptado. Ang: Angiotensina, NEP: endopeptidase neutra, PEP:prolilendopeptidase, ECA: enzima conversora de angiotensina, AMPA: aminopeptidase A, AMPN: Aminopeptidase N, AMPD: aminopeptidase D.

A ECA possui influência tanto no sistema-renina-angiotensina quanto no sistema caliceína-cinina (SCC), tendo um efeito pressor na conversão de Ang I a AngII, porém no SCC ela possui efeito contrário, degradando o peptídeo hipotensor, bradicinina (BK) (Vanhoutte e cols., 1995). O SCC constitui na formação de bradicinina (BK) através da ação enzimática da caliceína sobre o cininogênio (Schmaier, 2002). Após a liberação da bradicinina ela pode atuar em dois tipos de receptores, tipo 1(B1 ou induzível) e tipo 2 (B2 ou constitutivo) (Leeb-Lundberg e cols., 2005), sendo o B2 normalmente predominante e com alta afinidade pela bradicinina, enquanto o B1 é expresso na superfície celular em resposta a injúria e inflamação (Enquist e cols., 2007). Esse receptor induzível está relacionado à resposta inflamatória, regulação do balanço energético pela sinalização influenciada pela leptina, neovascularização e angiogênese (Maurer e cols., 2011). O receptor B2 está relacionado com a liberação de prostaglandinas e participa de uma interação

inibitória com a enzima óxido nítrico sintase endotelial que é revertida pela bradicinina, acoplando assim a bradicinina com a via do óxido nítrico, gerando vasodilatação (Campbell, 2003). O efeito biológico da bradicinina pode ser aumentado pela ação da Ang 1-7 através da liberação de produtos da óxido nítrico sintase e ciclooxigenase (Paula e cols., 1995).

O óxido nítrico (NO) é outro mecanismo utilizado pelo organismo para controle da pressão arterial (Das & Kumar, 1995). Ele é um gás altamente difusível, gerado através do substrato l-arginina pela ação das três isoformas da óxido nítrico sintase (NOS) (Palmer e cols., 1988), uma delas é a endotelial, a neuronal e a induzível (Forstermann e cols., 1995). O NO desempenha diversas funções, entre elas modificação do tônus vascular gerando vasodilatação, atua na defesa do organismo destruindo parasitas e células tumorais, possui efeito antioxidante e aumenta a função diastólica (Shah & MacCarthy, 2000). No sistema nervoso central ele participa da liberação de neurotransmissores, influencia a memória e regula a atividade elétrica neuronal (Jung e cols., 2012).

Estudos demonstram que em estados de desnutrição intrauterina há diminuição na síntese da NOS endotelial (Franco e cols., 2002) e que a restrição alimentar perinatal reduz a quantidade de NOS neuronal em ratos (Zhang e cols., 2010). Além disso, trabalhos com desnutrição proteica relatam alterações no reflexo cardiopulmonar, quimiorreflexo e barorreflexo (Bezerra e cols., 2011; Penitente e cols., 2007; Tropa e cols., 2001). Essa mesma deficiência proteica também modifica o sistema renina angiotensina e o sistema nervoso simpático (Gomide e cols., 2013a), do mesmo modo que dietas hipocalóricas (Casiero & Frishman, 2006) e deficiência de vitamina B12 (Sucharita e cols., 2012) geram alterações na pressão arterial e frequência cardíaca. Contudo, sabendo que na anorexia nervosa há o consumo de dietas pobres em calorias e nutrientes, com alta prevalência de problemas cardiovasculares é relevante ter um modelo experimental para estudar como e onde essa alimentação inadequada influencia no controle cardiovascular.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Estudar a influência da restrição alimentar nos sistemas que controlam a pressão arterial.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a padronização bioquímica e fisiológica do modelo experimental de restrição alimentar;
- Avaliar os pesos úmidos e secos dos órgãos dos animais submetidos à restrição alimentar;
- Avaliar os reflexos Bezold-Jarisch, barorreceptor e quimiorreflexo em ratas submetidas à restrição alimentar;
- Avaliar o óxido nítrico plasmático e a óxido nítrico sintase em ratas submetidas à restrição alimentar;
- Avaliar o sistema nervoso simpático através dos receptores α_1 e β adrenérgicos em ratas submetidas à restrição alimentar;
- Avaliar o sistema renina angiotensina e bradicinina em ratas submetidas à restrição alimentar.

MATERIAIS E MÉTODOS

MODELO ANIMAL

Para a execução deste trabalho utilizamos 128 ratas Fisher com o peso entre 200 e 220g cedidos pelo Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto – CCA. Os animais retirados do CCA foram levados para o Biotério de Experimentação do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular.

Antes de iniciar os experimentos, os animais ficaram três dias no biotério de experimentação para ambientalização e passado esse período alojou-os em gaiolas individuais de 30x19x13 cm durante todo o período de tratamento dietético. Os animais foram mantidos a 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*. A comida foi oferecida conforme o grupo experimental, o controle recebeu ração *ad libitum* e restrição alimentar recebeu 60% a menos de ração que a média consumida pelo grupo controle. Os animais ficaram acondicionados dessa maneira por 14 dias até a realização de cirurgias e experimentação.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com aprovação prévia do Comitê de Ética da Universidade Federal de Ouro Preto nos protocolos nº 2010/35 e nº 2012/10 . Os experimentos foram sempre realizados de acordo com a Lei Arouca (Lei 11.794) e o Guia de Uso e Cuidados de Animais de Laboratório do *National Research Council, EUA*.

RESTRIÇÃO ALIMENTAR

O modelo de restrição alimentar escolhido constitui na oferta de ração ao grupo restrito de 40% da ingestão média da ração consumida pelo grupo controle durante 14 dias, ou seja, realizou-se uma restrição alimentar de 60% de calorias, micro e macro nutrientes. Todos os animais foram tratados com ração comercial Nuvilab® e após o período de controle dietético os animais foram submetidos aos

procedimentos cirúrgicos e experimentais, sendo que nesse período os grupos permaneciam recebendo as respectivas dietas.

ESTIMATIVA DA INGESTÃO ALIMENTAR

Para padronização do modelo experimental e definição da quantidade de ração que os animais consumiriam, os mesmos foram colocados em gaiolas individuais e diariamente a quantidade de ração consumida era quantificada. Em seguida, realizou-se uma média da quantidade de ração consumida diariamente durante 14 dias pelo grupo controle e após a aquisição dessa quantidade, reduziu-se 60% da média. Para o grupo com restrição alimentar foi oferecido 40% da quantidade de ração consumida pelo controle, também por 14 dias.

PREPARO DE DROGAS E SOLUÇÕES

Angiotensina I: Preparou-se uma solução mãe diluindo Angiotensina I (Sigma) em uma solução de PBS. A dose utilizada para administração i.v. foi 20ng/Kg e 10ng/Kg de peso no volume de 0,1mL/100g de animal, separando alíquotas de 0,3mL mantidos no congelador a -4°C.

Angiotensina II: Preparou-se uma solução mãe diluindo Angiotensina II (Sigma) em uma solução de PBS. A dose utilizada para administração i.v. foi 200ng/Kg de peso no volume de 0,1mL/100g de animal, separando alíquotas de 0,3mL mantidos no congelador a -4°C. Já para administração i.c.v. (ventrículo lateral) utilizou-se a dose de 25pmol/ μ L no volume de 100nL/animal, separando alíquotas de 10 μ L mantidos a -4°C.

Anestésico (Isoflurano): O isoflurano foi administrado por via aérea na dose de 2 – 2,5% em 2L de oxigênio (O₂) por minuto.

Anestésico (Solução de Ketamina + Xilazina): A solução foi preparada pela adição de 2 mL de Xilazina 2% (p/v) a 10 mL de Ketamina 10% (p/v) e posteriormente utilizada da seguinte forma: dose (ketamina: 80mg/kg ; Xilazina: 7mg/kg) e volume (0,1mL/100g de animal; *i.m.*).

Antibiótico (Pentabiótico Veterinário): utilizado na prevenção de infecções, aplicou-se a seguinte dose: 4.800UI de penicilina, 2mg de estreptomicina e 2mg de diidroestreptomicina por kg de peso. O volume injetado foi 0,1 mL/100g de animal por via *i.m.*

Antiinflamatório [Ketoflex 1% p/v (Cetoprofeno)]: empregado com o objetivo de reduzir inflamação e dor decorrente de procedimentos cirúrgicos, aplicou-se a dose 0,03mL/300g de animal no volume de 0,1mL/300g de animal, via *i.m.*

Captopril: A solução foi preparada a partir da diluição do fármaco em uma solução de PBS, sendo a concentração final de 2m/Kg com infusão em bolus *i.v.*.

Cianeto de potássio: A solução foi preparada a partir da diluição de cianeto de potássio (Sigma) em uma solução de PBS, sendo a concentração final de 40µg/Kg com infusão em bolus *i.v.*.

Cloridrato de prazosina: Diluiu-se em PBS quantidade suficiente de cloridrato de prazosina (Sigma) para atingir a concentração final de 1mg/Kg. A solução foi infundida em bolus via *i.v.*

Fenilbiguanida: Solução preparada a partir da diluição de Fenilbiguanida (Aldrich chemical) em PBS com concentração final de 5,0µg/Kg infundido em bolus por via endovenosa.

Heparina: Diluiu-se a solução de heparina 5.000UI em PBS para a preparação da solução final com 125UI em 25mL. A quantidade utilizada de heparina foi o suficiente para preenchimento das cânulas arteriais.

Cloridrato de Lidocaína 2%: Diluiu-se no momento da utilização 0,1mL da solução em 0,2ml de PBS.

L-fenilefrina: Diluiu-se o fármaco (Sigma) em PBS com concentração final de 50µg/mL, sendo infundida i.v. com o auxílio de uma bomba de infusão. A velocidade de infusão foi de 2,2mL/h com volume infundido de 0,1mL. A seringa utilizada foi de vidro com o tamanho de 57mm.

L-NAME: O fármaco (Sigma) foi diluído em uma solução de PSB e posteriormente infundiu-se por via endovenosa, em bolus um volume total de 0,1mL com concentração final de 2mg/Kg.

Losartana: A solução foi preparada a partir da diluição de Losartan (Sigma) em uma solução de PBS. Para infusão i.v. utilizou-se a dose de 10mg/Kg de peso no volume de 0,1mL/100g de peso, separando alíquotas de 0,3mL mantidos no congelador a -4°C. Já para a administração i.c.v. (ventrículo lateral) utilizou-se a dose 10µg por animal no volume de 2µL, separando alíquotas de 10µL mantidos a -4°C.

Nitroprussiato de sódio: Diluiu-se o fármaco (Sigma) em PBS com concentração final de 100µg/mL, sendo infundida i.v. com o auxílio de uma bomba de infusão. A velocidade de infusão foi de 1,5mL/h com volume infundido de 0,1mL. A seringa utilizada foi de vidro com o tamanho de 57mm.

PBS (Salina tamponada com fosfato; pH 7,2): Para o preparo de PBS diluiu-se 8,18g de NaCl P.A., 1,98 g de Na₂HPO₄.7H₂O P.A. e 0,26 g de NaH₂PO₄.H₂O P.A. (Synth, LABSYNTH Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP) em água ultra-purificada (Milli – Q®) q.s.p. 1000 mL. Ajustou-se o pH da solução para 7,2, conforme a necessidade com HCl ou NaOH. A solução foi esterilizada por autoclavação 120°C e 1,0 Kg/cm² durante 20 minutos, conforme protocolo em vigor no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular.

Propranolol: Preparou-se a solução diluindo Propranolol (Sigma) em uma solução de PBS, utilizando a dose de 10mg/Kg de animal em um volume de 0,1mL/100g de animal, i.v.. Foram feitas alíquotas de 0,3mL mantidas no congelador a -4°C.

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) 50mm a outro tubo de PE de 10mm de circunferência. As medidas utilizadas foram as seguintes: cânula arterial – 13,0cm de PE 50 soldado em 3,0cm de PE 10. Cânula venosa – 13,0cm de PE 50 soldado em 2,0 cm de PE10.

Confecção da Cânula-guia e cânula injetora

As cânulas-guia (CG) foram confeccionadas utilizando-se agulha 23G, ajustadas através de eletrocorrosão até o comprimento de 10 mm. Já as cânulas injetoras foram confeccionadas a partir da agulha gengival 30G e ajustadas a 11 mm, também através de eletrocorrosão. Assim, no momento da microinjeção, a extremidade da injetora permanecia 1,0 mm abaixo da extremidade da CG, correspondendo a região do ventrículo lateral, de acordo com as coordenadas utilizadas, anteroposterior: -0,9; dorsoventral: -3,2; latero-lateral: +0,9, usando como referência o Bregma (Paxinos). As coordenadas utilizadas para animais do grupo controle com restrição alimentar foram as mesmas.

CIRURGIAS

Implante de cânulas-guia dirigidas ao ventrículo lateral

Com o auxílio de um aparelho estereotático (Stoelting Co., Illinois, EUA), implantamos a CG de 10 mm em direção ao VL. Para isso, os animais foram anestesiados com solução de Ketamina e Xilazina (i.m.) e em seguida, tricotomizados na região entre os pavilhões auditivos e os olhos, acomodados e fixados no estereotático com a barra dental a 3,3mm abaixo da linha interaural. A

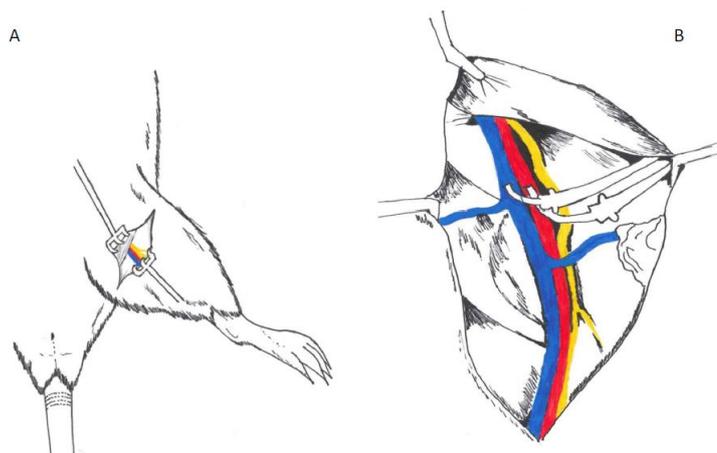
região tricotomizada foi submetida à assepsia com PVPI degermante e, após injetou-se subcutânea cloridrato de lidocaína 2% associado a epinefrina, para provocar uma vasoconstrição local. A região superior do crânio foi exposta a partir de uma incisão mediana e um orifício foi realizado para a fixação de parafusos de aço inoxidável no crânio dos animais para ancoragem da CG. A torre do estereotáxico foi angulada em zero e cânulas-guia foram posicionadas usando o bregma como referência de acordo com as coordenadas estereotáxicas segundo Paxinos e Watson, 2007, para o VL: -0,9mm posterior, +0,9mm lateral e -3,2mm ventral, usando o bregma como referência. Foram utilizados esses mesmos parâmetros em todos os grupos estudados. Em sequência, realizou-se um orifício para o implante da CG. Introduzimos a CG e fechamos a abertura cirúrgica com resina odontológica (acrílico dental polimerizável). Com o intuito de evitar a obstrução da CG, introduzimos um oclisor de aço inoxidável de mesmo comprimento da CG (10mm). Feito isso, os animais foram submetidos a cuidados pós-operatórios e passaram por um período de recuperação de 6 dias (adaptado Resende, 2012).

Implante de cânulas arterial e venosa

Passado o período de recuperação, os animais foram novamente submetidos aos procedimentos pré-cirúrgicos (sedação e anestesia), no entanto, utilizando-se de anestésico inalatório (Isoflurano 2 – 2,5% - 2l/min de O₂) para a realização do implante de cânulas femorais. Em seguida, realizou-se a tricotomia da região inguinal e do dorso, seguida de assepsia destes locais com PVPI degermante. Através de uma pequena incisão na região inguinal, o trígono femoral foi exposto, os vasos femorais identificados e separados do nervo femoral (figura 5). Um cateter de polietileno soldado por aquecimento a PE-50 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. A fim de garantir a não oclusão do cateter (formação de trombo) após a inserção nos vasos, o mesmo foi preenchido com solução de salina heparinizada (125 UI/mL) e a ponta do cateter exposta foi obstruída com um pino de aço inoxidável. Após a introdução do cateter, este foi passado pelo tecido subcutâneo do animal, com o auxílio de um pequeno

tubo de metal (trocáter), até a sua exteriorização na região interescapular. Terminado o procedimento, os locais de incisão foram suturados.

Os animais foram submetidos a um período de recuperação por 48hs antes do início dos procedimentos experimentais. No momento do registro a extremidade do cateter que foi inserido na artéria femoral foi conectada ao sistema de aquisição de dados para obtenção dos sinais de PA e FC (adaptado Abreu, 2012).



(Fortes, 2010)

Figura 5: Esquema simplificado da canulação da artéria (vermelho) e da veia (azul) femoral.

CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS

Após as cirurgias, todos os animais receberam injeção s.c. de cetoprofeno (Ketoflex®) e uma dose profilática de antibiótico (Pentabiótico Veterinário - Fort Dodge, São Paulo, Brasil), para prevenção de inflamações e infecções, e posteriormente alocados em gaiolas individuais. Após a cirurgia para implante de cânula-guia, os ratos foram mantidos sobre manta térmica até a passagem completa do efeito do anestésico, a fim de evitar hipotermia. Posteriormente, 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*.

REGISTROS E ANÁLISES DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA E FREQUÊNCIA CARDÍACA

Para obtenção do registro dos parâmetros cardiovasculares, a cânula inserida na artéria femoral dos ratos 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 uma coleta contínua da PAP, calculando a partir desta, os valores de FC e pressão arterial média (PAM).

Protocolo para avaliação do óxido nítrico plasmático

Para avaliar o óxido nítrico plasmático, após o período basal, infundimos PBS com 15 min de intervalo entre a próxima infusão. Após esse período infundimos por via endovenosa L-NAME em bolus e registramos as alterações cardiovasculares por 20 min (figura 6). A análise deste parâmetro foi realizada comparando as alterações da PAM e FC no decorrer do registro, assim como também foi realizado a comparação da alteração média (delta) dos mesmos parâmetros 5 min após a infusão.

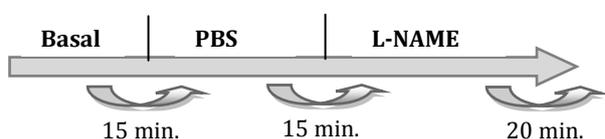


Figura 6: Linha temporal representativa da infusão de drogas para testar óxido nítrico plasmático.

Protocolo para avaliação do quimiorreflexo, Bezold-Jarisch e barorreflexo

Para os reflexos cardiovasculares registrou-se um período mínimo de 15 minutos para o animal acostumar com o ambiente e suas PA e FC ficarem em valores próximos aos considerados padrões para ratos. Após este período basal, infundimos PBS para avaliar o aumento do volume plasmático ou se o veículo causava alguma alteração. Após 15 min. infundimos cianeto de potássio (KCN) em bolus para testar o quimiorreflexo. Após os valores de PAM e FC retornarem próximos do basal, infundimos em bolus fenilbiguanida (PHEB) para testar o reflexo Bezold-Jarisch. Novamente, assim que os reflexos retornaram aos valores basais para testar o barorreflexo infundimos em rampa fenilefrina (PHE) e após a normalização dos valores de PAM e FC infundimos também em rampa nitroprussiato de sódio (NPS). Todos os fármacos foram colocados de uma maneira randômica, o intervalo entre as drogas durava em média de 15 min. e o teste dos três reflexos foi realizado no mesmo animal (figura 7).

Para analisar as respostas do KCN e PHEB fizemos a comparação da amplitude da resposta em relação aos valores basais (5min.), ou seja, analisamos o os valores no maior ponto imediatamente após a injeção da droga (20seg.), desconsiderando efeitos posteriores. Para o teste do barorreflexo foi infundido em rampa PHE e NPS e na sua análise consideramos o menor ou maior valor de PAM e FC atingido após a injeção das drogas. Selecionamos o intervalo de infusão e adquirimos a cada 1 segundo valores de PAM e seus respectivos valores de FC. Esses valores representaram os pontos para construção da barocurva para cada animal e o grau de dispersão dos dados.

A partir destas barocurvas individuais obtiveram-se a sigmóide média para cada grupo, os valores de platô superior e inferior e o valor de PAM50. As sigmóides foram obtidas segundo a equação I, descrita abaixo (Cardoso, 2003):

$$FC = FC_{\max} + \frac{FC_{\min} - FC_{\max}}{1 + e^{-\left(\frac{PAM - PAM_{50}}{b}\right)}} \quad (\text{Equação I})$$

Onde FC_{\max} é a frequência cardíaca no platô superior, FC_{\min} é a frequência cardíaca no platô inferior, PAM é a pressão arterial média, PAM_{50} é a pressão arterial média no ponto médio do intervalo de frequência entre os platôs superior e inferior e b é o coeficiente de curvatura. O ganho barorreflexo máximo para cada grupo foi inferido a partir dos valores de pico da primeira derivada das respectivas sigmóides individuais. O ganho foi calculado a partir dos valores de variações máximas de PAM e FC segundo a equação II, descrita abaixo:

$$Ganho = \frac{\Delta_{\text{máximo}} FC}{\Delta_{\text{máximo}} PAM} \quad (\text{Equação II})$$

onde $\Delta_{\text{máximo}} FC$ é a variação máxima de FC e $\Delta_{\text{máximo}} PAM$ é a variação máxima de pressão arterial média decorrentes das injeções de nitroprussiato de sódio ou L-fenilefrina. Estes valores de ganho foram comparados entre os grupos, onde todos os dados foram reunidos gerando um valor médio de ganho. Intervalos de 10 segundo precedentes a cada estimulação do barorreflexo foram tomados pra determinação de PAM e FC para cada animal ao longo do experimento.

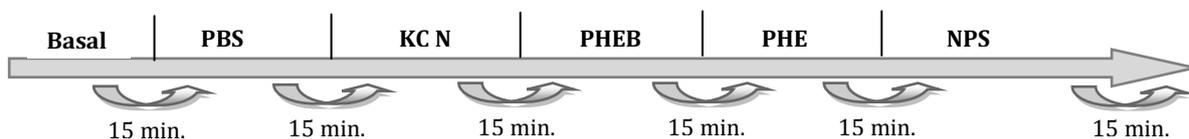


Figura 7: Linha temporal representativa da infusão de drogas para testar os reflexos cardiovasculares.

Protocolo para avaliação do sistema nervoso simpático

O sistema nervoso simpático foi avaliado através dos receptores α e β adrenérgicos. Os animais passaram pelo protocolo experimental que consiste em um período de ambientalização do animal até estabilizar os parâmetros cardiovasculares. Após esse período basal infundimos PBS como um controle da alteração de volume e do efeito do veículo. Estabilizando os parâmetros

cardiovasculares, 15 minutos em média, infundimos prazosina para avaliar os receptores α_1 adrenérgicos, registrando a resposta por 30 min (figura 8A). Em outro grupo de animais ao invés de infundir prazosin colocou-se propranolol com o intuito de avaliar os receptores β adrenérgicos (figura 8B). Em ambos os registros comparamos os valores basais com a alteração (delta) média da PAM e FC 5 minutos subsequentes a infusão.

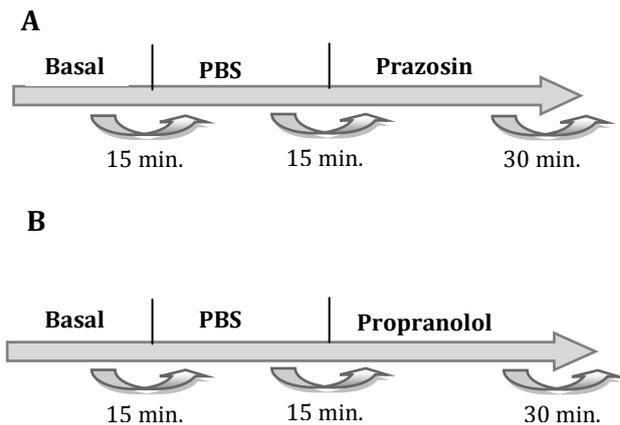


Figura 8: Linha temporal representativa da infusão de drogas para testar os receptores α_1 (A) e β adrenérgicos (B).

Protocolo para avaliação da angiotensina I, ECA e bradicinina

Na avaliação da angiotensina I, ECA e bradicinina o protocolo iniciou com o registro do período basal, em seguida infundimos em bolus por via endovenosa bradicinina (BK) 0,5 μ g/0,1mL, BK 1 μ g/0,1mL, Ang I 10ng/0,1mL, Ang I 20ng/0,1mL, captopril 2mg/Kg, BK 0,5 μ g/0,1mL e Ang I 20ng/0,1mL, nesta sequencia. As drogas foram colocadas com um intervalo mínimo de 5 min e no máximo de 10 min, no caso após a infusão de captopril (figura 9). Neste experimento comparamos o valor do pico da resposta com o valor obtido no registro do período basal. Após obter o delta, este foi comparado tanto em relação a diferentes doses quanto com a dose anterior e posterior ao captopril.

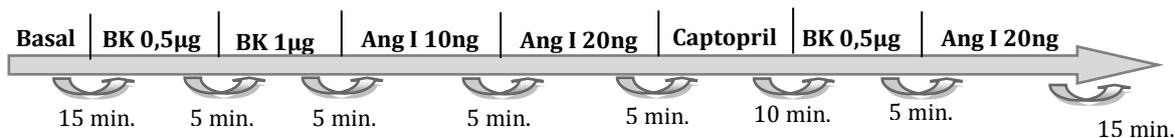
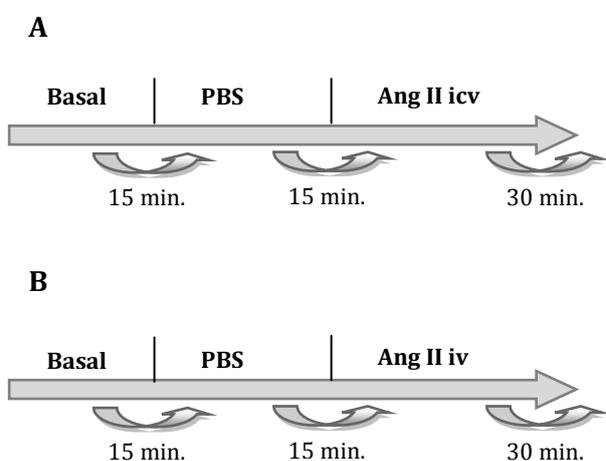


Figura 9: Linha do tempo representativa da infusão de drogas endovenosa para testar Ang I, ECA e bradicinina.

Protocolo para avaliação do sistema renina angiotensina

Neste grupo avaliamos o sistema renina angiotensina periférico e central. Antes de qualquer teste, após o animal estar ambientado injetamos PBS e após 15 min. colocamos as drogas a serem testadas. Em um primeiro grupo realizamos a ativação dos receptores de angiotensina através da infusão endovenosa e micro injeção intracerebroventricular (icv) de angiotensina II. Os testes foram feitos de maneira randômica, sendo que no primeiro dia testava-se a via central (figura 10A) e no dia seguinte a via periférica (figura 10B), e vice versa. Em um segundo grupo o protocolo foi semelhante, porém ao invés de ativar houve o bloqueio dos receptores AT1 com losartana tanto icv (figura 10C) quanto por via endovenosa (figura 10D), também de forma aleatória e em dias diferentes.

A análise deste experimento, independente da droga injetada, consistiu na construção de gráficos que demonstrem a variação da PAM e FC no decorrer do registro quanto a amplitude da resposta 5 ou 10 min após a infusão ou micro injeção.



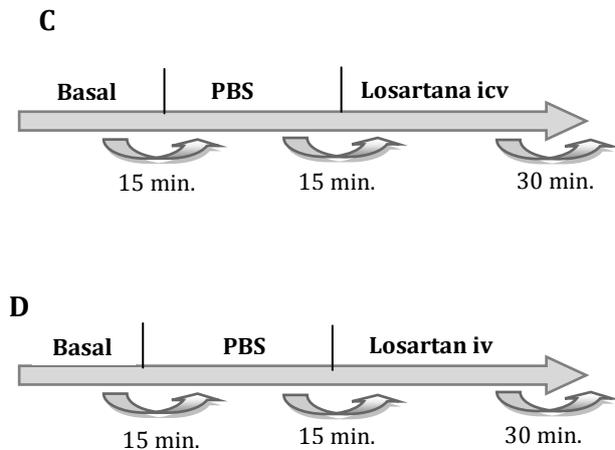


Figura 10: Linha do tempo representativa da infusão de drogas endovenosa (B e D) e icv (A e C) para testar os receptores de angiotensina II.

PROCEDIMENTOS DAS MICROINJEÇÕES

Para a micro injeção de salina, AngII ou Losartana foram utilizadas cânulas injetoras de 11mm conectadas a um tubo de polietileno (Norton, 0.010) e a uma seringa Hamilton de 5 μ L preenchida com água deionizada. O polietileno foi preenchido com a solução a ser microinjetada, e entre a água deionizada e a substância contida no polietileno formou-se uma pequena bolha. A cânula injetora foi introduzida na cânula-guia e as soluções de teste foram injetadas com os respectivos volumes. Durante a administração das substâncias, o movimento descendente da bolha de ar indicou o sucesso da microinjeção. Após a retirada da cânula injetora a mesma foi testada, simulando a microinjeção e a observação de saída de líquido pela injetora, para verificar possíveis obstruções.

ANÁLISE DA MICROINJEÇÃO POR AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Ao término dos Protocolos Experimentais, injetou-se de 100 nL a 500 nL (volume dependente da quantidade de droga injetada no experimento) do corante

Comassie blue (2%), no sítio de microinjeção no ventrículo lateral, para subsequente confirmação histológica. Os animais foram anestesiados com o dobro da quantidade de solução de Ketamina + Xilazina descrito anteriormente, submetendo-os a uma toracotomia para a exposição do coração. Através de punção cardíaca, realizou-se a perfusão com solução salina (0,9%), seguida de solução de paraformaldeído tamponado (4%). Após a retirada do cérebro, o mesmo foi fixado em solução de formaldeído tamponado 4% por 48 horas. Após este período, os cérebros foram transferidos para uma solução de sacarose a 20% (diluído em água deionizada) permanecendo por 24 horas. Cortes coronais, na região do ventrículo lateral, com a espessura de 50 μ m foram obtidos com o auxílio de um Criostato (Leica CM 1850, Alemanha). Os cortes foram colocados em lâminas de histologia previamente gelatinizadas, corados com vermelho neutro (1%) e posteriormente examinados por microscopia óptica (figura 11).

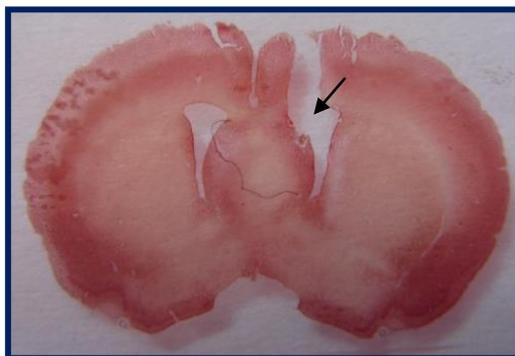


Figura 11: Fotomicrografia do corte histológico confirmando o local de microinjeção no ventrículo lateral (seta preta) de um animal com restrição alimentar.

PESAGEM DOS ÓRGÃOS

Os animais foram anestesiados com o dobro da quantidade de solução de Ketamina + Xilazina descrito anteriormente, submetendo-os a uma toracotomia para

a exposição do coração para realização da punção cardíaca. Após a retirada completa de sangue, todos os órgãos foram retirados. Imediatamente após a coleta dos tecidos, os mesmos foram pesados e colocados na estufa à 50° C por 72 horas para obter o peso seco dos órgãos.

DOSAGEM DE ANGIOTENSINA II POR RADIOIMUNOENSAIO

Os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (70 mg/kg animal) e xilazina (15 mg/kg animal), em seguida amostras de sangue contendo aproximadamente 1,0 mL foram obtidas por punção cardíaca. Para a coleta do sangue utilizou-se seringas de 5mL submetidas a ambiente com solução de EDTA a 100mM. O sangue obtido foi transferido, imediatamente, para eppendorfs contendo 100 µL de um coquetel de inibidores (dipiridil, ortofenantrolina, tetratoato de sódio e EDTA), todos na concentração de 100 mM. O plasma foi obtido a partir da centrifugação do sangue a 12°C, por cinco minutos a 1500xg. O sobrenadante foi transferido para outro eppendorf.

O protocolo para dosagem de angiotensina II por radioimunoensaio foi baseado em Gualberto e cols, (1992). Para a realização do ensaio foi utilizada uma solução padrão de Ang II na concentração de 10^{-4} M. Essa solução foi diluída seriadamente em tampão RIE (fosfato de sódio 20 mM contendo gelatina 0,1% (p/v), azida sódica 0,1% (p/v), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM e pH ajustado para 7,4), para obtenção de soluções na faixa de concentração de 10^{-8} a 10^{-11} M para a realização da curva padrão de Ang II. O volume de angiotensina II pipetado a cada tubo da curva variava de 40 a 200 µL e sempre feitos em duplicata. Previamente, a angiotensina II marcada (125 I-Ang II) foi diluída com tampão RIE de forma a se obter aproximadamente 8000 contagens por minuto (cpm) em 100 µL de solução e 100 µL eram pipetados em todos os tubos do ensaio. Para controle da atividade angiotensinásica, uma alíquota de 100 µL de plasma fresco foi adicionada a tubos teste, na presença de Ang II padrão em concentração pré-definida. Em seguida, pipetou-se 100 µL de anticorpo anti-angiotensina II (diluído 1/4000) em todos os

tubos do ensaio. Ao final, o volume de cada tubo foi ajustado para 500 μ L com tampão RIE. Após agitação, os tubos do ensaio foram incubados a 4°C por 18-24 horas. Transcorrido o período de incubação foi realizada a separação da angiotensina II radioativa livre, da ligada ao anticorpo por meio da utilização de uma suspensão contendo carvão ativado e dextran T-70, na relação de 0,625 g para 0,0625 g, respectivamente, para cada 100 mL de tampão RIE. Essa suspensão era mantida em banho de gelo sob agitação e da mesma era pipetado 1,0 mL em todos os tubos do ensaio, exceto nos tubos controles referentes ao total. Nestes tubos eram pipetados 1,0 mL de tampão RIE. Após agitação em vortex, os tubos foram submetidos à centrifugação a 4°C, por 20 minutos, a 3000xg e a radioatividade dos sobrenadantes contada em cintilador gama. Após a contagem de cada tubo, os cálculos foram realizados baseando-se na relação de dependência do logito B/Bo em função do logaritmo da concentração do padrão (Rodbard e cols, 1969), sendo B e Bo, as contagens obtidas referentes a angiotensina marcada ligada ao anticorpo, na presença e na ausência da angiotensina padrão, respectivamente. No ensaio também, havia três tubos (triplicata) que continham apenas angiotensina II marcada (antígeno marcado) para a determinação da ligação não específica, representada pela contagem obtida na ausência do anticorpo anti-angiotensina. Experimento realizado na Universidade Federal de Minas Gerais, no laboratório de Biofísica.

DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO PLASMÁTICO

A dosagem foi realizada pelo kit BioAssay System (DINO – 250) usando o método de Griess adaptado. Esse método consiste em um ensaio colorimétrico que dosa nitritos, um metabólito do NO, já que este gás possui uma meia vida menor que 10 segundos. Os animais foram eutanasiados e coletou-se 3mL de sangue pelo plexo braqueal. A amostra coletada foi centrifugada a 10.000xG em 4°C, utilizando somente o sobrenadante.

Desproteínação da amostra biológica

Em tubos de polipropileno, 100µL da amostra (plasma) foram adicionados a 80µL de sulfato de zinco 75mM e centrifugados a 14000rpm, por 5 min. à 4°C. Em seguida o sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 120µL de NaOH 55mM. Outra centrifugação foi feita a 14000rpm, por 5 min. à 4°C. Então o sobrenadante foi misturado a 70µL de tampão glicina, fornecido pelo kit. Após essa desproteínação, as amostras foram utilizadas no teste.

Preparo dos reagentes

Tampão de ativação diluído: foram misturados 1 volume do tampão 3x, que é o fornecido pelo kit a 2 volumes de água destilada. Foi armazenado por 12 meses, a 4 °C.

Ativação do cádmio: foram utilizados 3 grânulos de Cádmio por amostra. Estes grânulos foram transferidos para um tubo falcon de 50mL e lavados três vezes com água destilada. Após esse procedimento, foi retirado o resíduo de água com uma pipeta e adicionado 200µL de tampão de ativação diluído por grânulo de cádmio. Foi incubado a temperatura ambiente por 5 min. e misturado intermitentemente. Em seguida, os grânulos foram novamente lavados três vezes com água destilada e secados com papel de filtro. Esse procedimento de ativação deve ser realizado em no máximo 20 minutos antes do teste.

Procedimento para curva padrão

O padrão de óxido nítrico foi feito dissolvendo 30µL de nitrito padrão estoque em 570µL de água. Identificaram-se 8 tubos de polipropileno e adotou-se o procedimento delineado na tabela abaixo:

CONC (µMOL/L)	50	40	30	20	15	10	5	0
Padrão nitrito(µL)	150	120	90	60	45	30	15	0
H2O (µL)	0	30	60	90	105	120	135	150
Tampão glicina (µL)	50	50	50	50	50	50	50	50

Procedimento para dosagem

Na amostra que foi desproteïnada foram adicionados 3 grânulos de cádmio ativados e incubados por 15 min. a temperatura ambiente. A confecção da curva padrão e as dosagens nas amostras foram feitas em placas de Elisa. Em cada well foi colocado 50µL de reagente A, 100µL de amostra ou padrão e 50µL de reagente B. A placa foi incubada 5 minutos a temperatura ambiente e lida em espectrofotômetro a 570 nm. O branco utilizado para os cálculos de concentração foi o ultimo ponto da curva que possui concentração "0" de nitrito.

Cálculos

Foi feito um gráfico expressando a concentração do padrão (Eixo Y) X absorvância do padrão (Eixo X). Após uma regressão linear, foi determinada a equação da reta. Esta equação foi utilizada para determinar a concentração de óxido nítrico. Todas as concentrações foram obtidas em µmol/L. Para se obter a concentração de óxido nítrico no fígado em relação à concentração de proteínas totais, este parâmetro foi determinado pelo método de Lowry. Assim a concentração de óxido nítrico no fígado foi expressa em µmoles/mg de proteína.

DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Para padronizar o modelo experimental realizaram-se algumas dosagens bioquímicas, entre elas: albumina, hemoglobina, ureia, creatinina, proteínas totais, fosfatase alcalina, glicose, triglicérides, colesterol total, colesterol HDL e LDL, ALT e AST.

Ao final dos 14 dias de dieta controle ou restrita, os animais foram submetidos ao jejum de 12 horas, em seguida os mesmos foram anestesiados com isoflurano e o sangue retirado pelo plexo braquial. A amostra foi acondicionada em eppendorfs esterilizados e separados de acordo com a futura utilização. Para dosagens que utilizam plasma, no eppendorf adicionou-se previamente anticoagulante, GLISTAB KF 12g/dL + EDTA 6g/dL (LABTEST DIAGNÓSTICA, MG, Brasil) na quantidade de 1 gota/3 mL de sangue. Já quando se utilizou soro, o sangue foi armazenado em

eppendorf sem anticoagulante. Todas as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 4000rpm para separação do soro ou plasma, que foram armazenados em *eppendorfs* esterilizados e armazenados a -80°C para posterior realização dos ensaios bioquímicos que seguiram os protocolos dos Kits LABTEST (LABTEST DIAGNÓSTICA, MG, Brasil).

Vale ressaltar que para todas as dosagens bioquímicas realizadas, nenhum animal foi submetido a procedimentos cirúrgicos.

AVALIAÇÃO DO CICLO ESTRAL

Como o trabalho foi desenvolvido com fêmeas torna-se necessário avaliar a influência dos hormônios femininos em todos os experimentos. Como ao término do período de dieta poucas ratas encontravam-se no mesmo ciclo e se esperasse para realizar os experimentos quando todas estivessem na mesma fase, o período de restrição iria variar de animal para animal, podendo alterar muitos dos resultados. Assim, ao término da dieta, antes de iniciar qualquer experimento os animais tinham o ciclo estral avaliado para posterior análise para observar possível influência no experimento.

O ciclo foi determinado conforme descrito por Marcondes, 2002. Os animais eram segurados pelo dorso e com a utilização de uma pipeta, inseriu-se a ponteira no orifício vaginal e coletou-se a secreção vaginal com 10µL de PBS. A secreção retirada era colocada em uma lâmina higienizada e fazia-se visualização a fresco no microscópio na lente objetiva de 40x. Para cada tipo de célula encontrada no esfregaço vaginal há um ciclo correspondente. Quando se observa células epiteliais classifica-se no proestro, havendo leucócitos a fase do ciclo é diestro, já encontrando células corniformes a fase é o estro e quando há um pouco de cada célula a fase é o metaestro.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os dados tiveram uma análise não pareada e foram antes de qualquer teste avaliados se eram dados paramétricos ou não pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Posteriormente a essa análise os dados considerados paramétricos com comparação de duas médias utilizamos o teste t de Student. Comparação de duas médias com dados não paramétrico o teste utilizado foi Mann-Whitney, neste caso expressamos os valores com mediana, valor mínimo e valor máximo. Já na comparação com mais de duas médias e duas variáveis utilizamos o teste de variância two way com pós-teste de Boferroni. Consideramos o nível de significância de 0,05 e todos os valores para testes paramétricos foram expressos com média \pm EPM.

RESULTADOS

PADRONIZAÇÃO DA RA - AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E FISIOLÓGICA -

Após escolher o modelo experimental a ser estudado, os animais foram separados e passaram pelos respectivos tratamentos dietéticos por 14 dias. Nesse período a ingestão alimentar foi quantificada para que posteriormente fosse possível a redução de 60% para oferecer ao grupo RA. O controle consumiu uma média diária de 13,50g \pm 0,19g ou 37,8Kcal (n=18) de ração. Assim a quantidade de ração oferecida diariamente para o grupo RA foi 5,5g ou 15,1Kcal (figura 12A).

Em relação ao acompanhamento do peso corporal, a partir do segundo dia de dieta o grupo restrito já apresenta uma redução significativa. Essa diferença acentua-se a cada dia e permanece até o 14^o dia quando os animais RA apresentam

uma redução de aproximadamente 15% no peso corporal (C: 224,1g \pm 3,17, n=18 vs. RA: 179,2g \pm 3,45) (figura 12B).

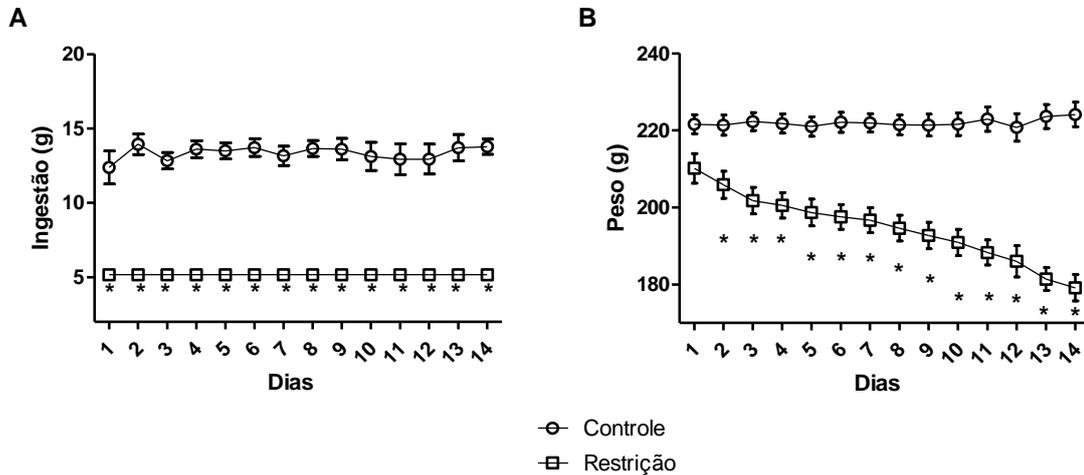


Figura 12: Ingestão alimentar estimada e acompanhamento do peso corporal. Quantificação do consumo médio diário de ração pelo grupo controle para posterior cálculo da quantidade de ração oferecida ao grupo RA, n=18 (A) e acompanhamento do peso corporal dos animais controle e submetido à restrição alimentar durante 14 dias, n=18 (B). * Diferença estatística entre controle e RA; ANOVA two way, com pós-teste de Bonferroni (p<0,05).

Juntamente com a avaliação do peso corporal dos animais e a quantificação da ingestão alimentar, avaliou-se o ciclo estral diariamente definindo quantos dias cada animal permanecia em cada fase. Nessa avaliação pode-se perceber que os animais controle possuíam uma variação similar enquanto os animais que foram submetidos à restrição alimentar permanecem mais tempo na fase não ovulatória dentro da variação do ciclo deles (figura 13).

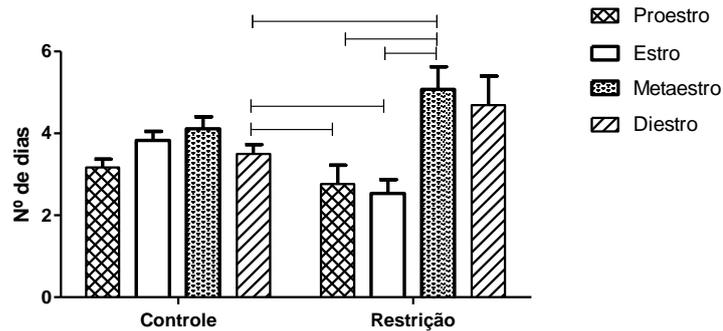


Figura 13: Ciclo estral. Avaliação diária do ciclo estral por esfregaço vaginal a fresco em animais controle e submetidos à restrição alimentar, n=18. -- Diferença estatística entre controle e RA; ANOVA two way, com pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

Verificamos, ainda, se a ausência de uma alimentação adequada alterava os padrões bioquímicos dos animais. Após as dosagens observamos no grupo RA há diminuições significativas nas concentrações plasmáticas de creatinina, albumina, AST, colesterol total e colesterol LDL. Ureia e glicose houve um aumento na concentração plasmática desses parâmetros após o período de dieta (n=8), como demonstra a tabela 1.

Tabela 1: Efeitos da dieta (controle e restrição alimentar) sobre os parâmetros bioquímicos.

Parâmetro bioquímico	Controle	Restrição	P valor
Ureia (mg/dL)	44,95 ± 0,99	58,56 ± 3,14 *	p = 0,0010
Creatinina (mg/dL)	1,21 ± 0,03	1,03 ± 0,04 *	p = 0,0040
Hemoglobina (g/dL)	14,88 ± 1,14	12,42 ± 0,88	p = 0,1103
Albumina (g/dL)	2,83 ± 0,04	2,39 ± 0,06 *	p<0,0001
Fosfatase alcalina (U/L)	42,99 ± 1,73	47,12 ± 1,90	p = 0,1302
Proteínas totais (g/dL)	6,98 ± 0,208	6,73 ± 0,11	p = 0,3199
Glicose (mg/dL)	213,0 (173,6 -258,4)	258.9 (203.9 - 432.6) *	p = 0,0208
ALT	35.02 (31.31 - 44.99)	28.18 (20.76 - 51.24)	p = 0,3181
AST	77,71 ± 1,51	72,76 ± 1,45 *	p = 0,0336
Triglicérides (mg/dL)	37,92 ± 3,68	29,40 ± 2,17	p = 0,0662
Colesterol total (mg/dL)	96,92 ± 7,09	69,22 ± 3,08 *	p = 0,0030
Colesterol HDL (mg/dL)	43,20 ± 5,14	39,10 ± 3,09	p = 0,5062
Colesterol LDL (mg/dL)	53,73 ± 9,54	30,12 ± 3,92 *	p = 0,0382

Valores expressos com mediana (valor mínimo; valor máximo) ou média ± EPM, n=8. AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase). *Diferença estatística do controle versus restrição, teste t Mann Whitney não pareado para comparação de glicose e ALT e teste t de *Student* não pareado para demais parâmetros (p<0.05).

Outro parâmetro que avaliamos para caracterizar o modelo experimental foi o peso úmido e seco absoluto e relativo dos órgãos. Após a pesagem dos órgãos úmidos observamos que a dieta causa uma diminuição no peso do coração, rim e fígado (tabela 2). Porém quando corrigimos esse valor para o peso relativo à 100g de peso corporal do rato, observamos que os animais com RA possuem o cérebro mais pesado e os outros tecidos não apresentam alterações (tabela 3). Após os tecidos secarem 72 horas na estufa à 50°C os animais com RA apresentaram o peso absoluto do coração, rim, fígado e pulmão menores quando comprados ao controle (tabela 4). Já quando avaliamos o peso relativo dos órgãos secos, observa-se que somente o fígado permanece com o peso inferior ao controle (tabela 5).

Tabela 2: Peso úmido absoluto dos órgãos.

Órgão (g)	Controle	Restrição	p valor
Coração	0,618 (0,541; 0,819), n=23	0,566 (0,437; 0,660), n=27 *	p = 0,0009
Rim	1,580 ± 0,048, n=15	1,390 ± 0,035, n=17 *	p = 0,0033
Fígado	7,611 ± 0,282, n=23	6,387 ± 0,258, n=27 *	p = 0,0024
Pâncreas	0,665 ± 0,094, n=13	0,535 ± 0,038, n=15	p = 0,1930
Baço	0,769 ± 0,076, n=11	0,664 ± 0,024, n=18	p = 0,1284
Pulmão	1,367 ± 0,076, n=15	1,210 ± 0,046, n=18	p = 0,0793
Cérebro	1,706 ± 0,017, n=7	1,650 ± 0,043, n=8	p = 0,2810

Valores expressos com mediana (valor mínimo; valor máximo) ou média ± EPM. * Diferença estatística do controle versus restrição, teste t Mann Whitney não pareado para comparação do peso do coração e teste t de *Student* não pareado para demais órgãos (p<0.05).

Tabela 3: Peso úmido relativo dos órgãos / 100g peso corporal

Órgão (g/100g)	Controle	Restrição	p valor
Coração	0,317 ± 0,007, n=23	0,320 ± 0,007, n=26	p = 0,7756
Rim	0,758 ± 0,023, n=15	0,801 ± 0,013, n=17	p = 0,1109
Fígado	3,721 ± 0,123, n=23	3,665 ± 0,133, n=27	p = 0,7595
Pâncreas	0,316 ± 0,044, n=13	0,297 ± 0,020, n=15	p = 0,6982
Baço	0,369 ± 0,038, n=11	0,368 ± 0,015, n=19	p = 0,9893
Pulmão	0,653 ± 0,032, n=15	0,708 ± 0,040, n=19	p = 0,3174
Cérebro	0,797 ± 0,013, n=7	0,925 ± 0,010, n=7 *	p<0,0001

Valores expressos com média ± EPM. * Diferença estatística do controle versus restrição, teste t de *Student* não pareado (p<0.05).

Tabela 4: Peso seco absoluto dos órgãos.

Órgão (g)	Controle	Restrição	p valor
Coração	0,156 ± 0,001, n=7	0,125 ± 0,006, n=8 *	p = 0,0008
Rim	0,351 ± 0,011, n=7	0,300 ± 0,006, n=8 *	p = 0,0014
Fígado	2,568 ± 0,136, n=7	1,863 ± 0,101, n=8 *	p = 0,0010
Pâncreas	0,196 (0,146; 0,306), n=5	0,239 (0,059; 0,276), n=9	p = 1,0000
Baço	0,198 ± 0,019, n=7	0,178 ± 0,015, n=8	p = 0,4213
Pulmão	0,271 (0,243; 0,473), n=7	0,236 (0,223; 0,272), n=8 *	p = 0,0205
Cérebro	0,469 ± 0,032, n=7	0,425 ± 0,017, n=8	p = 0,2442

Valores expressos com mediana (valor mínimo; valor máximo) ou média ± EPM. * Diferença estatística do controle versus restrição, teste t Mann Whitney não pareado para comparação do peso do pâncreas e pulmão, e teste t de *Student* não pareado para demais órgãos (p<0.05).

Tabela 5: Peso seco relativo dos órgãos / 100g peso corporal

Órgão	Controle	Restrição	p valor
Coração	0,073 ± 0,001, n=7	0,069 ± 0,002, n=8	p = 0,2509
Rim	0,167 (0,140; 0,181), n=7	0,162 (0,149; 0,194), n=8	p = 0,9551
Fígado	1,198 ± 0,059, n=7	1,024 ± 0,046, n=8 *	p = 0,0365
Pâncreas	0,095 ± 0,012, n=5	0,104 ± 0,014, n=8	p= 0,6496
Baço	0,093 ± 0,009, n=7	0,097 ± 0,007, n=8	p = 0,7161
Pulmão	0,131 (0,113; 0,215), n=7	0,133 (0,124; 0,148), n=8	p = 0,8665
Cérebro	0,219 ± 0,015, n=7	0,234 ± 0,009, n=8	p = 0,3860

Valores expressos com mediana (valor mínimo; valor máximo) ou média ± EPM. * Diferença estatística do controle versus restrição, teste t Mann Whitney não pareado para comparação do peso do rim e pulmão, e teste t de *Student* não pareado para demais órgãos (p<0.05).

Após determinar as alterações bioquímicas e o peso tecidual avaliamos se ocorrem alterações nos parâmetros fisiológicos, PAM e FC, após a dieta de restrição. Observamos que a RA causa uma diminuição da PAM (C: 113,4mmHg ±

1,463, n=62 vs. 107,2 mmHg \pm 1,276, n=65) (figura 14A) e diminuição na FC (C: 382,8 bpm \pm 4,883, n=62 vs. 361,5 bpm \pm 6,758, n=65) (figura 14B).

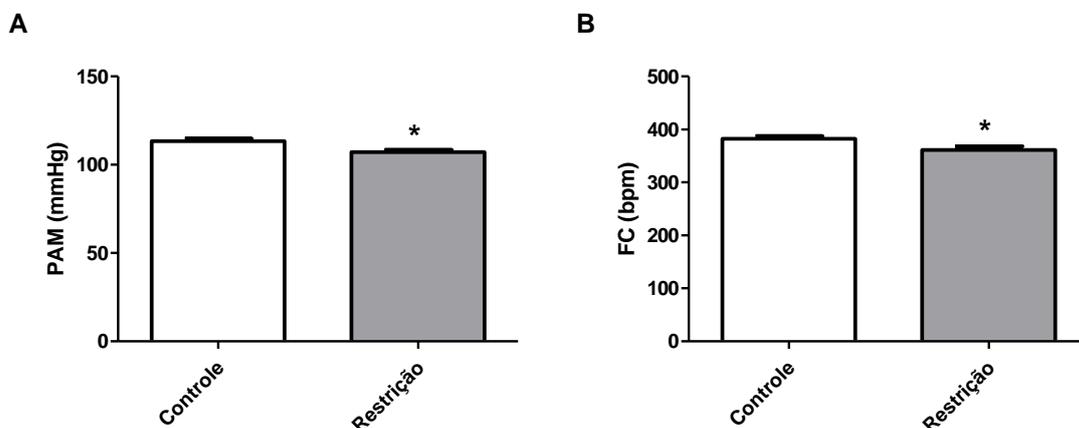


Figura 14: Pressão arterial média (A) e frequência cardíaca (B) em animais submetidos à restrição alimentar. *Diferença estatística entre controle e RA; Teste t de *Student* não pareado ($p < 0,05$).

ÓXIDO NÍTRICO E ÓXIDO NÍTRICO SINTASE

Já identificamos que a RA causa várias alterações bioquímicas e fisiológicas. Por conseguinte, procuramos investigar como estão os sistemas e reflexos que controlam a PAM e verificar se a hipotensão observada na RA seria causada por alterações nos mecanismos de controle da PAM. Sabendo que o óxido nítrico é uma molécula vasodilatadora e de grande importância para a manutenção da pressão arterial, após dosagens plasmáticas dessa substância, observa-se que a dieta diminui a quantidade de NO plasmático em relação ao controle (C: $0,21 \pm 0,02$, n=7 vs. RA: $0,16 \pm 0,0034$, n=7) – figura 15.

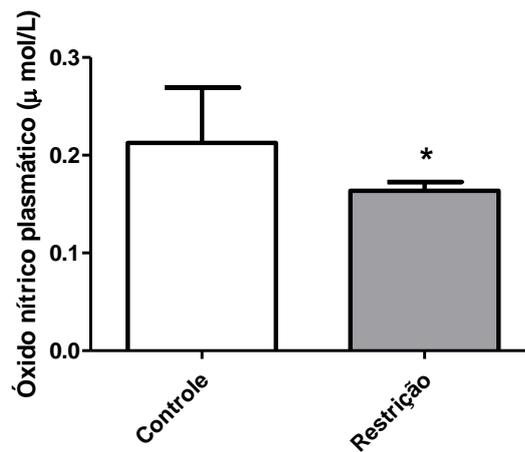


Figura 15: Óxido nítrico plasmático. Efeito da restrição alimentar nas concentrações plasmáticas de óxido nítrico. *Diferença estatística entre controle e RA; Teste t de *Student* não pareado ($p < 0,05$).

Porém quando bloqueamos a enzima óxido nítrico sintase, responsável pela síntese de NO através da infusão endovenosa em bolus de L-NAME observamos uma resposta pressora (C: $\Delta 23,76 \text{ mmHg} \pm 2,892$, $n=8$ vs. RA: $\Delta 26,99 \text{ mmHg} \pm 4,175$, $n=7$) (figura 16A) semelhante em ambos os grupos analisados, assim como a resposta bradicárdica (C: $\Delta -80,67 \text{ bpm} \pm 15,53$, $n=8$ vs. RA: $\Delta -41,94 \text{ bpm} \pm 30,06$, $n=7$) (figura 16B). Nos gráficos C e D ou E e F, podemos observar que o padrão de resposta permanece até o final do registro, com respostas pressóricas e bradicárdicas parecidas.

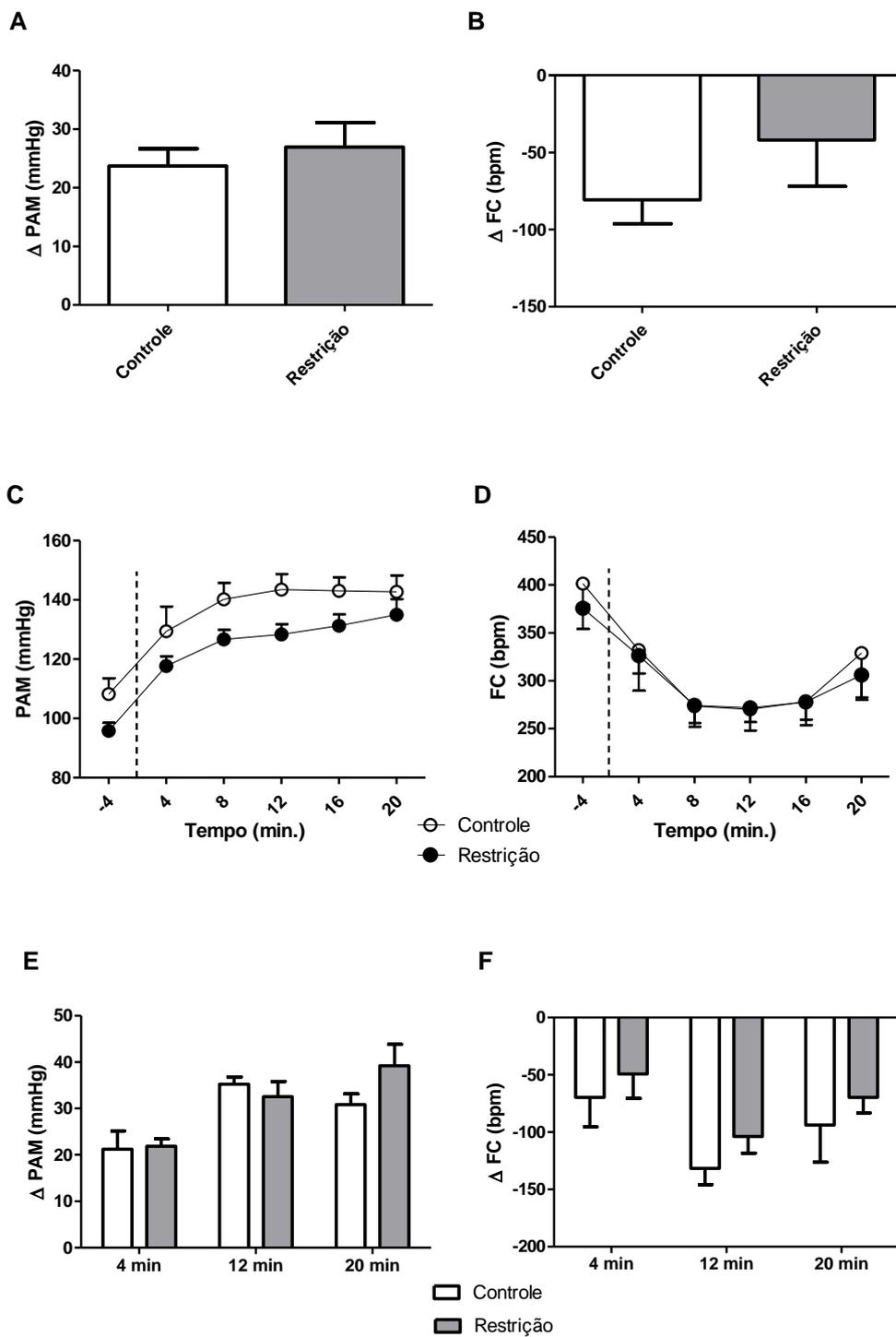


Figura 16: Bloqueio da enzima óxido nítrico sintase. Efeito da infusão de L-NAME na pressão arterial (A) e frequência cardíaca (B) nos animais submetidos à restrição alimentar. Os gráficos C e D são, respectivamente, a variação da pressão arterial e frequência cardíaca no decorrer do tempo, e os gráficos E e F, a comparação do delta da PAM e FC em determinados tempos. Teste t de *Student* não pareado para comparações entre dois deltas, Anova one way para mais de dois deltas e Anova two way para comparação das curvas ($p < 0,05$).

REFLEXOS CARDIOVASCULARES

Outro mecanismo que controla a PA com muita eficiência são os reflexos cardiopulmonares. Após a avaliação do quimiorreflexo através da infusão endovenosa de cianeto de potássio não observamos diferenças tanto para a PAM (C: Δ 17,36 mmHg \pm 3,16, n=10, RA: Δ 10,16 mmHg \pm 2,21, n=7) quanto para a FC (C: Δ -298,7 bpm \pm 24,17, n=10, RA: Δ -215,2 bpm \pm 43,60, n=7) (figura 17).

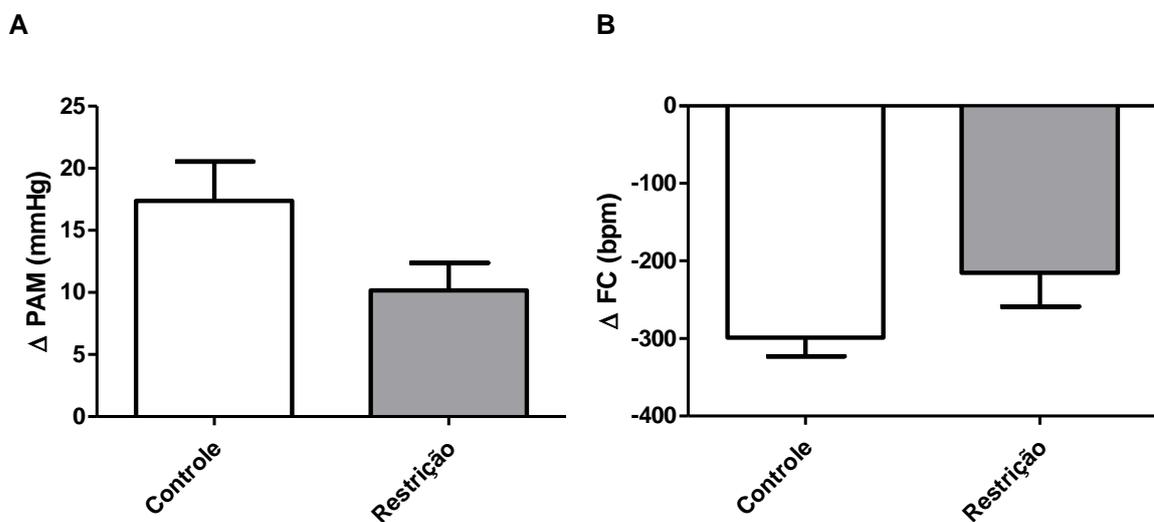


Figura 17: Quimiorreflexo. Efeito da estimulação com KCN do quimiorreflexo na pressão arterial (A) e frequência cardíaca (B) em animais submetidos à restrição alimentar. Teste t de *Student* não pareado ($p < 0,05$).

O reflexo Bezold-Jarisch foi avaliado após a infusão endovenosa de fenilbiguanida gerando uma resposta hipotensora mais acentuada em animais submetidos à restrição alimentar (C: Δ -13,61 mmHg \pm 2,24, n=9, RA: Δ -25,65 \pm 5,38, n=8), entretanto a resposta bradicárdica foi semelhante ao grupo controle (C: -309,3 \pm 18,50, n=9, RA: -292,0 \pm 20,12, n=8) (figura 18).

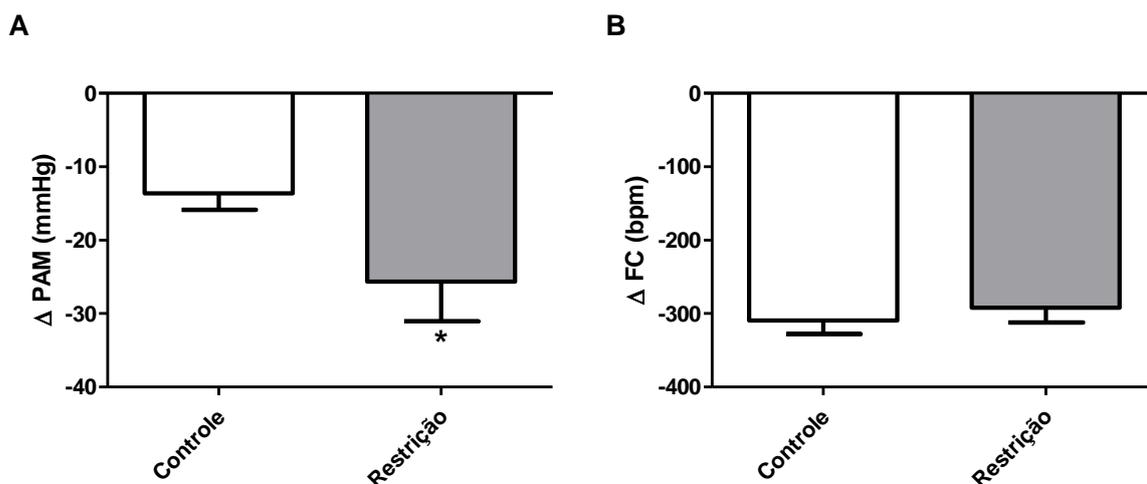
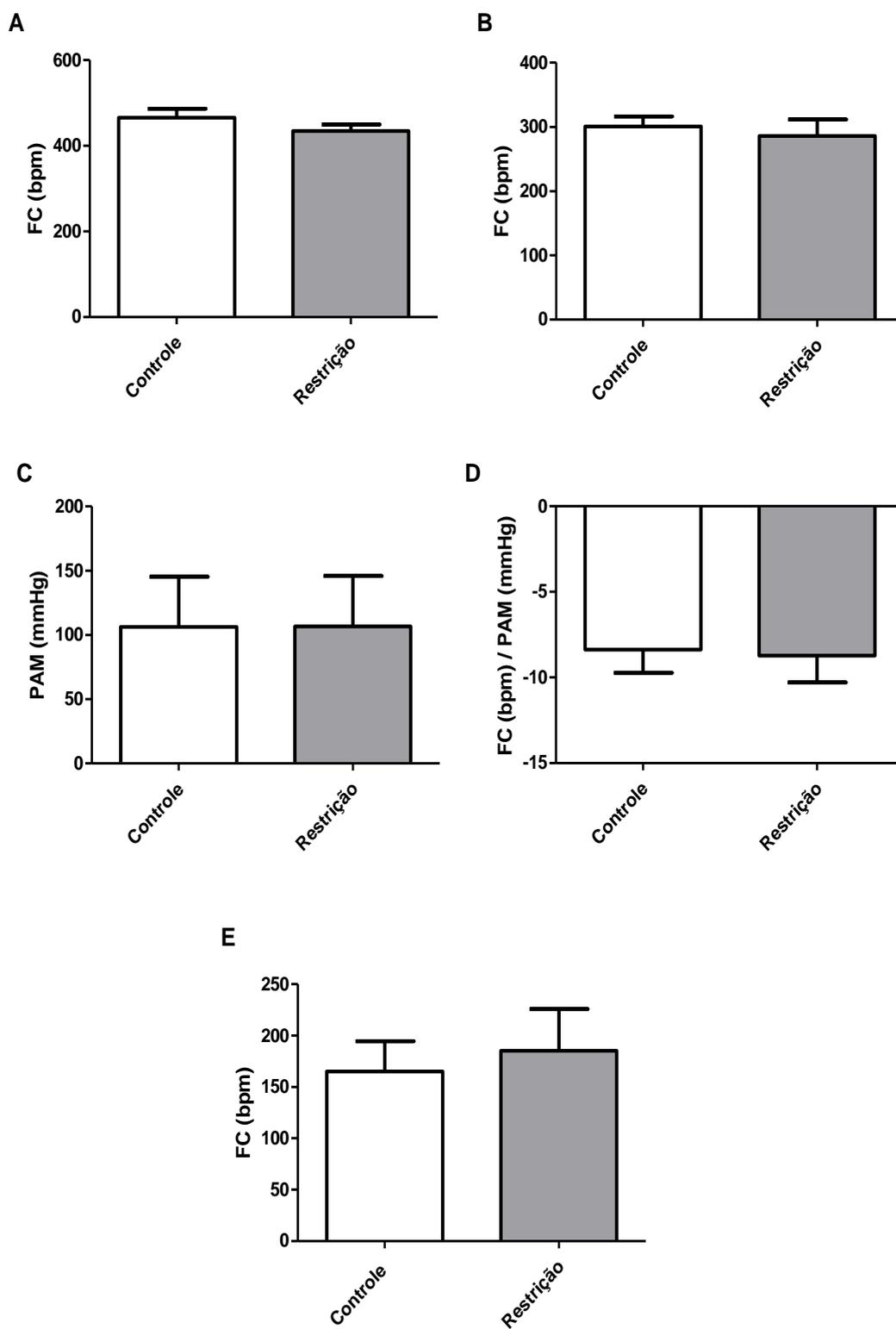


Figura 18: Reflexo Bezold-Jarisch. Alteração da pressão arterial (A) e frequência cardíaca (B) após estimulação do reflexo Bezold-Jarisch com fenilbiguanida em animais submetidos à restrição alimentar. * Diferença estatística entre controle e RA; Teste t de *Student* não pareado ($p < 0,05$).

O reflexo barorreceptor, outro mecanismo utilizado pelo corpo para controlar a PA, foi avaliado através da infusão em rampa de nitroprussiato de sódio e fenilefrina por via endovenosa. Para análise desse reflexo dividiu-se as análises de acordo com as respostas calculando o platô inferior (figura 19A) (C: $300,9 \text{ bpm} \pm 15,64$, $n=10$ vs. RA: $286,2 \text{ bpm} \pm 25,61$, $n=10$), platô superior (figura 19B) (C: $465,9 \text{ bpm} \pm 20,84$, $n=10$ vs. RA: $434,9 \text{ bpm} \pm 15,26$, $n=10$), MAP50 (figura 19C) (C: $115,6 \text{ mmHg} \pm 5,20$, $n=10$ vs. RA: $112,6 \text{ mmHg} \pm 5,15$, $n=10$), Ganho (figura 19D) (C: $-8,38 \text{ bpm/mmHg} \pm 1,34$, $n=10$ vs. RA: $-8,71 \text{ bpm/mmHg} \pm 1,56$, $n=10$) e range (figura 19E) (C: $165,0 \text{ bpm} \pm 29,40$, $n=10$ vs. RA: $185,3 \text{ bpm} \pm 40,67$, $n=10$). Sendo que não houve diferenças significativas nesses parâmetros. O gráfico 19 F é a representação da curva da função barorreflexa com todos os parâmetros anteriores agrupados e o gráfico 19 G é representativa do ganho.



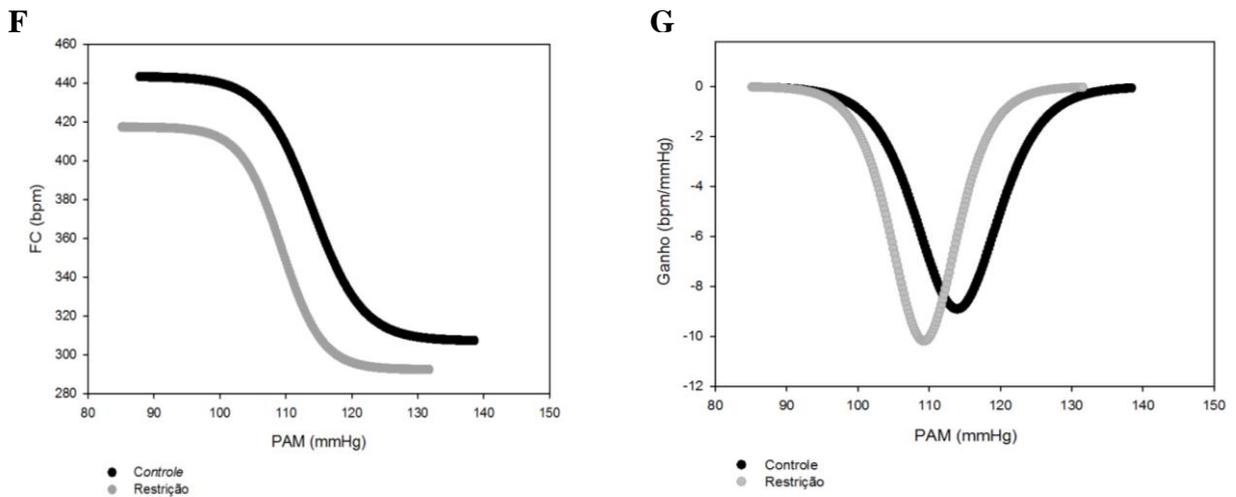


Figura 19: Barorreflexo: Estimulação do barorreflexo com fenilefrina e nitroprussiato de sódio em animais submetidos à restrição alimentar. Gráficos de A a E são componentes da curva da função (F) e o gráfico (G) é exemplificação do ganho. Teste t de *Student* não pareado ($p < 0,05$).

SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO

Após infusão endovenosa em bolus de prazosin, um antagonista α_1 adrenérgico, observamos uma resposta hipotensora maior nos animais com RA (C: $\Delta -11,47 \text{ mmHg} \pm 1,72$, $n=10$ vs. RA: $\Delta -17,61 \text{ mmHg} \pm 1,75$, $n=10$) e consequentemente uma resposta taquicárdica mais acentuada neste mesmo grupo (C: $\Delta 73,56 \text{ bpm} \pm 13,31$, $n=10$ vs. RA: $\Delta 124,2 \text{ bpm} \pm 14,40$, $n=10$) (figura 20).

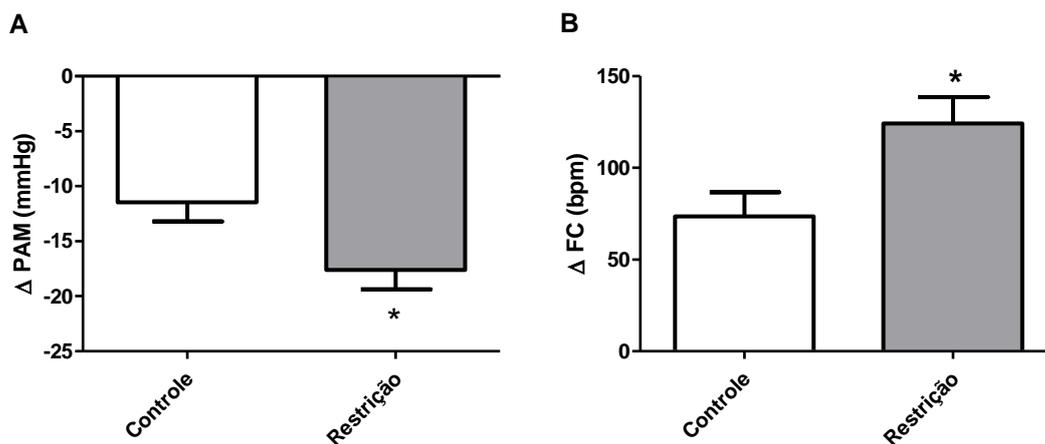


Figura 20: Receptores α_1 adrenérgico. Alterações na pressão arterial (A) e frequência cardíaca (B) após bloqueio dos receptores α_1 adrenérgicos com prazosin em ratos submetidos à restrição alimentar. * Diferença estatística entre controle e RA; Teste t de *Student* não pareado ($p < 0,05$).

Após a infusão em bolus de propranolol, um β bloqueador não específico, observamos uma resposta pressora significativamente menor nos animais submetidos à restrição alimentar (C: $\Delta 12,48 \text{ mmHg} \pm 0,53$, $n=6$ vs. RA: $\Delta 4,56 \text{ mmHg} \pm 1,27$, $n=8$). Em relação à FC não houve diferenças (C: $\Delta -81,23 \text{ bpm} \pm 17,44$, $n=6$ vs. RA: $\Delta -62,38 \text{ bpm} \pm 19,29$, $n=8$) (figura 21).

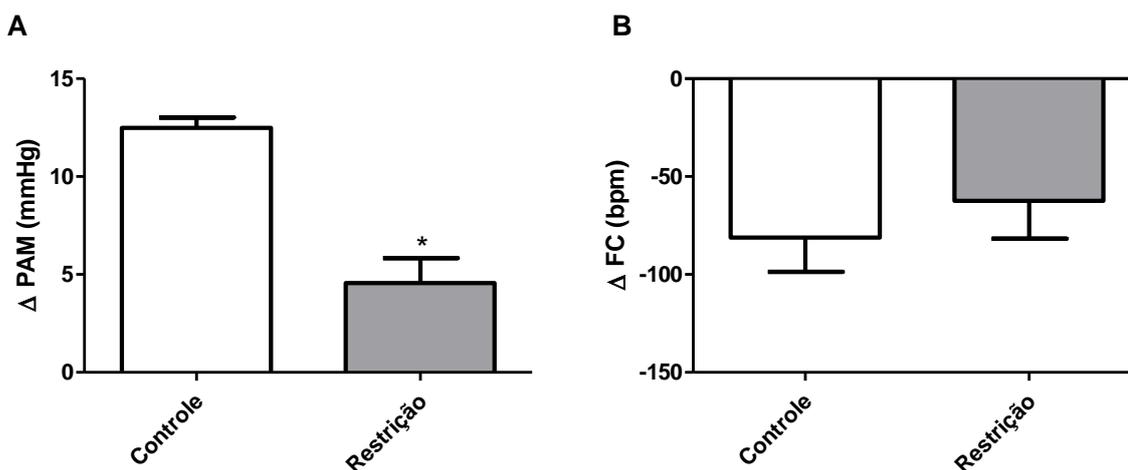
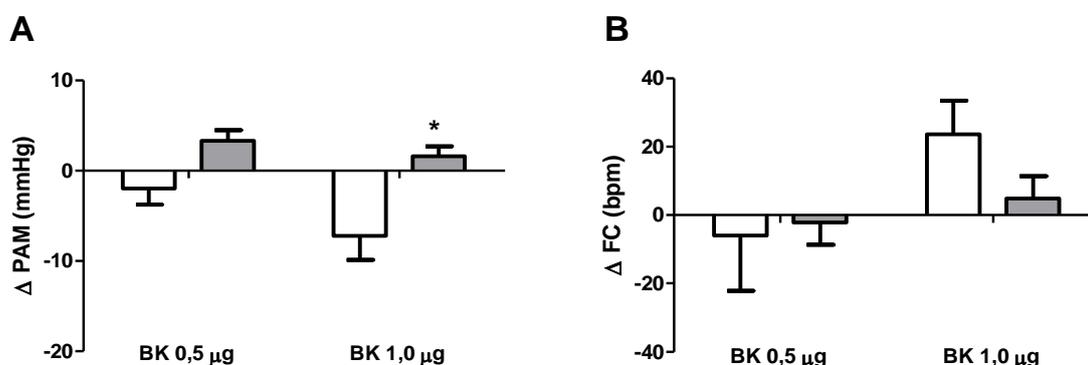


Figura 21: Receptores β adrenérgicos: Variação da pressão arterial (A) e frequência cardíaca (B) após bloqueio dos receptores β adrenérgicos com infusão de propranolol em animais submetidos à restrição alimentar. *Diferença estatística entre controle e RA; Teste t de *Student* não pareado ($p < 0,05$).

SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA - BRADICININA

Avaliamos também o efeito da infusão de diferentes concentrações de bradicinina, 0,5 μ g/0,1mL e 1,0 μ g/0,1mL, onde os animais submetidos à restrição alimentar apresentaram uma resposta hipertensora tanto para primeira (C: Δ -1,96 mmHg \pm 1,784, n=7 vs. RA: Δ 3,307 mmHg \pm 1,21, n=8) concentração quanto para a segunda (C: Δ -7,210 mmHg \pm 2,676, n=7 vs. RA: Δ 1,613 mmHg \pm 1,104, n=8) e os animais controle apresentaram uma resposta hipotensora, sendo que somente a segunda concentração foi significativamente diferente. Em relação a frequência cardíaca, não houve diferença de resposta na primeira concentração (C: Δ -5,948 bpm \pm 16,24, n=7 vs. RA: Δ -2,080 bpm \pm 6,56, n=8) e nem na segunda (C: Δ 23,73 bpm \pm 9,77, n=7 vs. RA: Δ 4,88bpm \pm 6,509, n=8) (figura 22A e B).

Assim como feito para a bradicinina, também testamos o efeito de duas concentrações de AngI, 10ng/0,1mL e 20ng/0,1mL. Na concentração de 10ng/0,1mL a restrição alimentar não causou alterações na pressão arterial (C: Δ 2,09 mmHg \pm 0,683, n=7 vs. RA: Δ 2,007mmHg \pm 1,071, n=8) e frequência cardíaca (C: Δ -1,73 bpm \pm 10,64, n=7 vs. RA: Δ -18,98 bpm \pm 9,624, n=8) (figura 22C eD). Já na concentração de 20ng/0,1mL houve diferença na resposta pressora (C: Δ 4,77 mmHg \pm 0,826, n=7 vs. RA: Δ 13,08mmHg \pm 2,216, n=8).



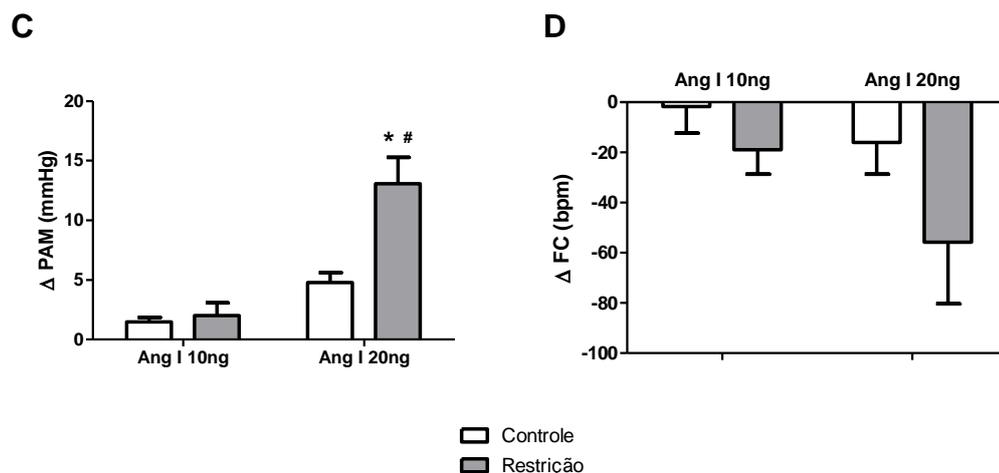


Figura 22: Bradicinina e angiotensina I. Alterações na pressão arterial e frequência cardíaca após infusão endovenosa de diferentes concentrações de bradicinina (A e B) e angiotensina I (C e D) em ratos submetidos à restrição alimentar. *Diferente do controle na mesma concentração; # Diferente da concentração anterior no mesmo grupo. Teste t de Student, não pareado ($p < 0,05$).

Após verificar o efeito da bradicinina e da angiotensina I nos animais submetidos à restrição alimentar, infundimos em bolus por via endovenosa captopril, o qual não influenciou na variação da pressão arterial (C: $\Delta -0,737 \text{ mmHg} \pm 0,805$, $n=7$ vs RA: $\Delta -0,010 \text{ mmHg} \pm 1,250$, $n=7$) e na frequência cardíaca (C: $9,515 \text{ bpm} \pm 5,64$, $n=7$ vs. RA: $\Delta 21,43 \text{ bpm} \pm 6,216$, $n=7$) (figura 23).

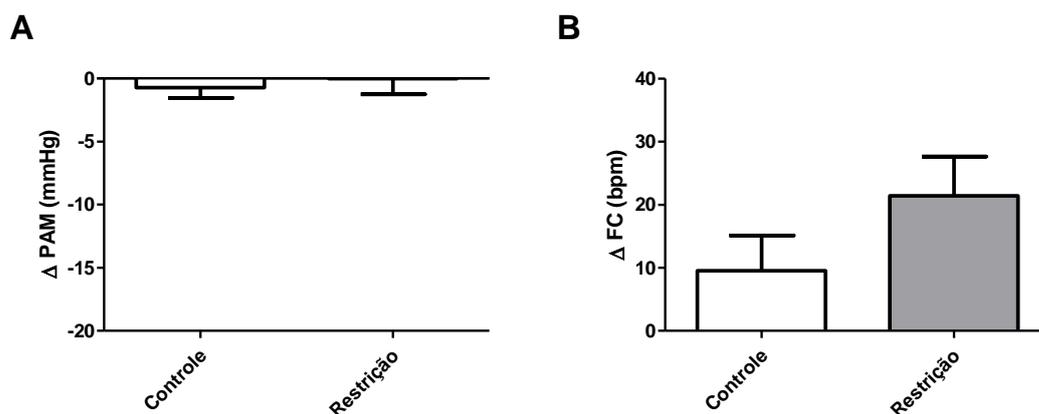


Figura 23: Bloqueio da ECA. Efeito da infusão endovenosa de captopril na pressão arterial (A) e frequência cardíaca (B) de ratos submetidos à restrição alimentar. Teste t de *Student* não pareado ($p < 0,05$).

Após a infusão do captopril infundimos novamente BK 0,5µg e Ang I 20ng para verificar o efeito do bloqueio da ECA (figura 24). Nessa parte do experimento observamos que o bloqueio da ECA foi eficiente, pois quando comparamos as respostas obtidas da infusão da BK após a infusão do captopril com as respostas obtidas antes do captopril, houve uma diminuição significativa na pressão arterial, tanto no grupo controle quanto na restrição alimentar (C_a : $\Delta -1,964\text{mmHg} \pm 1,784$, $n=7$ vs. C_d : $\Delta -14,85\text{mmHg} \pm 3,92$, $n=7$), (RA_a : $\Delta 3,307\text{mmHg} \pm 1,21$, $n=8$ vs. RA_d : $\Delta -11,11\text{mmHg} \pm 3,781$, $n=8$). Porém quando comparamos as respostas do controle e restrito após o captopril, não houve diferença na resposta hipotensora (C_d : $\Delta -14,85\text{mmHg} \pm 3,922$, $n=7$ vs. RA_d : $\Delta -11,11\text{mmHg} \pm 3,781$, $n=8$). Na comparação da FC não houve diferença nas comparações entre “antes controle” e “antes restrito”, entre “depois controle” e “depois restrito” (C_d : $\Delta 10,21\text{bpm} \pm 14,08$, $n=7$ vs. RA_d : $\Delta 30,41\text{bpm} \pm 7,29$, $n=8$), comparação entre “antes controle” com “depois controle” (C_a : $\Delta -5,948\text{bpm} \pm 16,24$, $n=7$ vs. C_d : $\Delta 10,21\text{bpm} \pm 14,08$, $n=7$) e entre “antes restrito” e “depois restrito” (RA_a : $\Delta -2,08\text{bpm} \pm 6,56$, $n=8$ vs. RA_d : $\Delta 30,41\text{bpm} \pm 7,295$, $n=8$). A infusão de Ang I ocasiona uma resposta pressora maior no grupo restrito, como demonstrado anteriormente, porém após o bloqueio da ECA com captopril, essa resposta foi abolida (RA_a : $\Delta 13,08\text{mmHg} \pm 2,216$, $n=7$ vs. RA_d : $\Delta 1,229\text{mmHg} \pm 1,130$, $n=8$). No grupo controle não houve diferença estatística entre a resposta antes do captopril com a resposta após o captopril (C_a : $\Delta 4,77\text{mmHg} \pm 0,826$, $n=7$ vs. C_d : $\Delta 0,155$, $\text{mmHg} \pm 0,459$, $n=7$). Na comparação entre a resposta pressora do grupo controle e a resposta pressora do restrito após a utilização do captopril, também não houve diferença (C_d : $\Delta 0,155$, $\text{mmHg} \pm 0,459$, $n=7$ vs. RA_d : $\Delta 1,229\text{mmHg} \pm 1,130$, $n=8$). Em relação à variação da FC não houve diferença entre “antes controle” e “depois controle” (C_a : $\Delta -16,07\text{bpm} \pm 12,67$, $n=7$ vs. C_d : $\Delta -1,839\text{bpm} \pm 6,006$, $n=7$), “antes restrito” e “depois restrito” (RA_a : $\Delta -55,77\text{bpm} \pm 24,56$, $n=7$ vs. RA_d : $\Delta -3,544\text{bpm} \pm 5,874$, $n=8$) e quando comparamos “depois restrito” com “depois controle” (C_d : $\Delta -1,839\text{bpm} \pm 6,006$, $n=7$ vs. RA_d : $\Delta -3,544\text{bpm} \pm 5,87$, $n=8$).

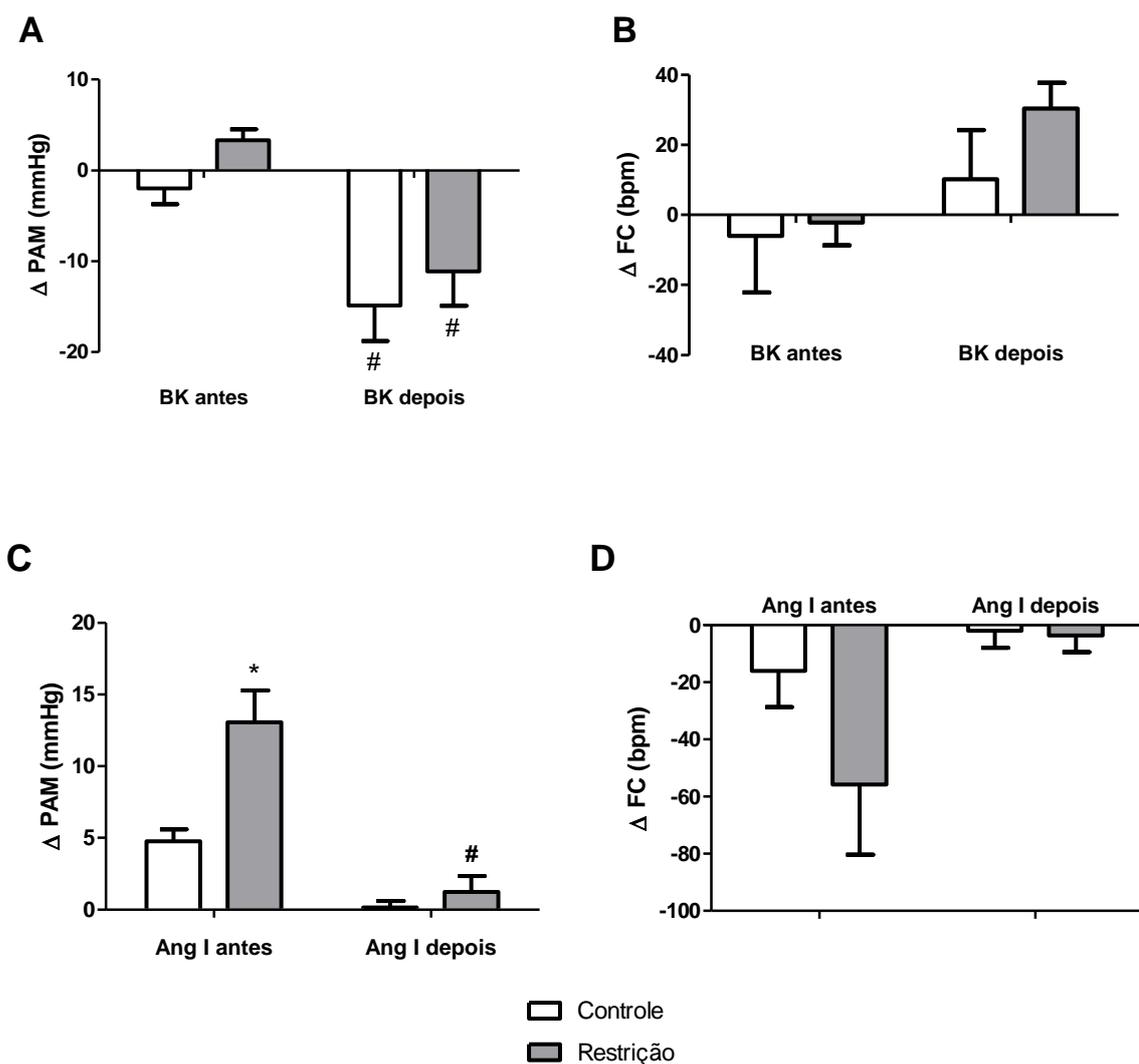


Figura 24: Efeito do captopril na resposta à bradicinina e angiotensina I. Comparação da variação da pressão arterial e frequência cardíaca causada pela bradicinina (A e B) e angiotensina I (C e D) antes e após infusão de captopril. *Diferente do controle no mesmo tempo. #Diferente do mesmo grupo. Teste t de *Student*, não pareado ($p < 0,05$).

Também avaliamos o efeito da infusão em bolus de angiotensina II (figura 25A e B). Após a infusão observamos que a resposta pressora no grupo RA era menor (figura A) quando comparado com controle (C: $\Delta 37,32 \text{ mmHg} \pm 1,87$, $n=7$ vs. RA: $\Delta 10,81 \text{ mmHg} \pm 1,75$, $n=7$). Entretanto, não houve diferença na FC (figura B) (C: $\Delta -91,02 \text{ bpm} \pm 15,92$, $n=7$ vs. RA: $\Delta -48,44 \text{ bpm} \pm 11,71$, $n=7$). Esse tipo de resposta foi similar após microinjeção intracerebroventricular de angiotensina II

(figura 25C e D), ou seja, uma resposta pressora menor no grupo RA (figura C) (C: Δ 18,92 mmHg \pm 1,42, n=8 vs. RA: Δ 11,36 mmHg \pm 2,34, n=8) e sem alterações na FC (figura D) (C: Δ -30,46 bpm \pm 15,25, n=8 vs. RA: Δ -6,48 bpm \pm 3,79, n=8).

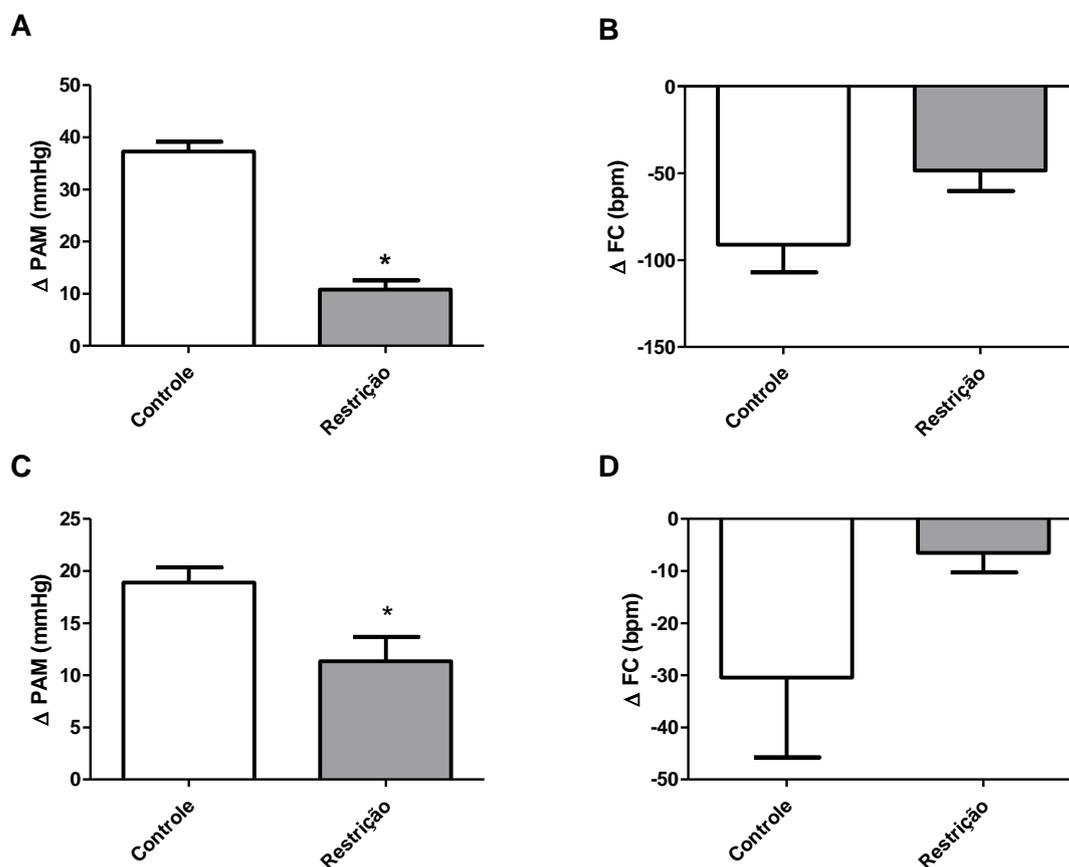


Figura 25: Angiotensina II. Alteração na pressão arterial e frequência cardíaca após infusão endovenosa (A e B) e microinjeção intracerebroventricular (C e D) de angiotensina II em ratas submetidas à restrição alimentar. * Diferença estatística entre controle e RA; Teste t de *Student* não pareado ($p < 0,05$).

A figura 26 é representativa da resposta pressora e bradicardica em relação ao tempo. Na figura A é a variação da PAM e B a resposta da FC após infusão endovenosa de angiotensina II. Nos gráficos C e D são os valores no decorrer do tempo da PAM e FC, respectivamente, após microinjeção icv. Contudo, nessa avaliação o grupo RA apresentou uma resposta pressora menor somente após microinjeção icv a partir de 4 minutos permanecendo até o 28^o minuto. As respostas

periféricas tanto da PAM quanto da FC quando avaliadas no decorrer do tempo foram semelhantes, assim como a resposta da FC na microinjeção icv.

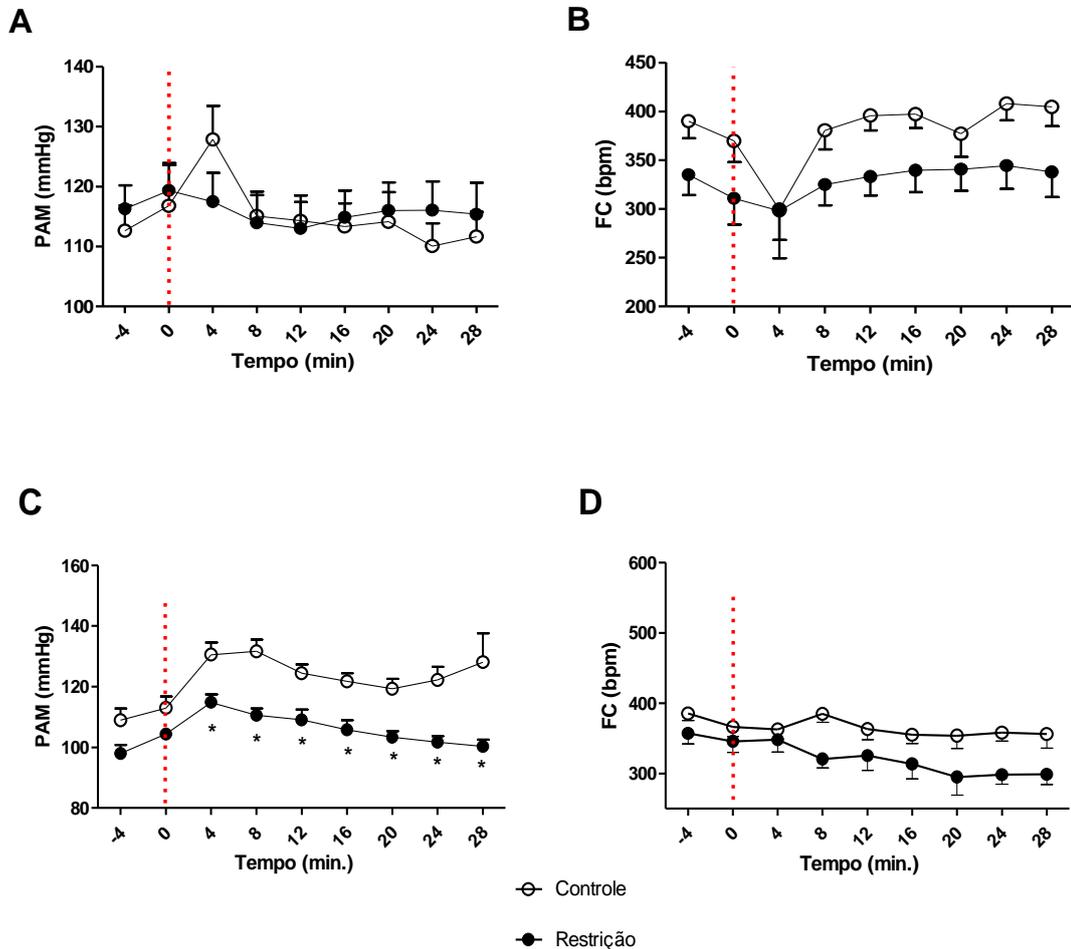


Figura 26: Curva da ação da angiotensina II. Análise do perfil da resposta pressora e bradicárdica após infusão endovenosa e microinjeção intracerebroventricular de angiotensina II em ratas submetidas à restrição alimentar. * Diferença estatística entre controle e RA no tempo determinado; ANOVA two way, com pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

Sabe-se que após a estimulação do sistema renina angiotensina o organismo que sofre restrição alimentar não consegue responder adequadamente com variações da PA. Isso nos levou a analisar se haveria uma alteração na concentração de angiotensina II. Após a dosagem desse peptídeo por radioimunoensaio (figura 27), não observamos diferenças nas concentrações

plasmáticas de angiotensina II nos animais com RA quando comparados com controle (C: $5,961 \times 10^{11}$ mol/L \pm 0,6720, n=7 vs. RA: $6,513 \times 10^{11}$ mol/L \pm 0,3487, n=8).

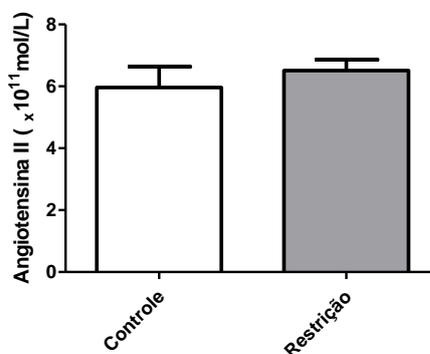


Figura 27: Angiotensina II. Dosagem da angiotensina II plasmática em ratos submetidas à restrição alimentar. Teste t de *Student*, não pareado, ($p < 0,05$).

Diante disso bloqueamos os receptores AT1 para verificar a importância desse sistema na manutenção da pressão arterial. Fizemos testes por via periférica (gráficos A e B) e central (gráficos C e D) com infusão endovenosa em bolus ou microinjeção icv de losartan. Após a infusão de losartan periféricamente, não houve alterações na PAM (gráfico A) (C: $\Delta -7,57$ mmHg \pm 1,97, n=8 vs. RA: $\Delta -7,22$ mmHg \pm 0,85, n=12) e FC (gráfico B) (C: $\Delta 36,42$ bpm \pm 15,09, n=8 vs. RA: $\Delta 28,26$ bpm \pm 14,42, n=12) quando comparamos com controle. Porém após a microinjeção icv, observamos uma resposta hipotensora maior no grupo RA (gráfico C) (C: $\Delta -0,035$ mmHg \pm 1,418, n=7 vs. RA: $\Delta -4,455$ mmHg \pm 1,146, n=11) e nenhuma alteração na FC (gráfico D) (C: $\Delta 5,592$ bpm \pm 14,87, n=7 vs. RA: $\Delta -17,84$ bpm \pm 10,16, n=11) (figura 28).

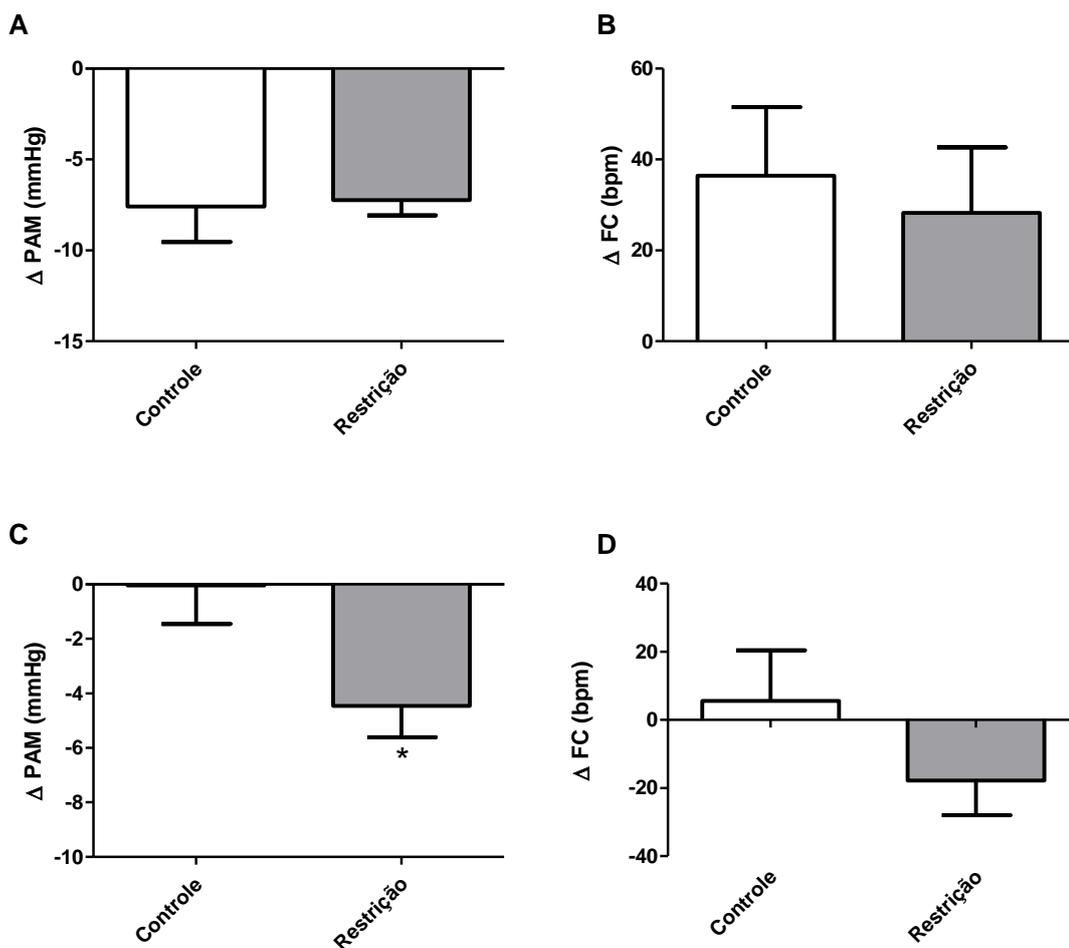


Figura 28: Receptores AT1. Variação da PAM e FC após bloqueio dos receptores AT1 periféricos (A e B) e centrais (C e D) com losartan em ratas submetidas à restrição alimentar. *Diferença estatística entre controle e RA; Teste t de *Student*, não pareado, ($p < 0,05$).

Além da análise da amplitude da resposta, também avaliamos a variação da PAM e FC no decorrer do tempo após o bloqueio dos receptores AT1 com losartan. Após infusão endovenosa não houve diferenças na PAM e FC (figura 29 A e B), porém quando microinjetamos o losartan icv, observamos que a partir do 16^o minuto há uma resposta hipotensora maior quando os animais são submetidos à restrição alimentar (figura C), permanecendo essa diferença até o 28^o minuto. Entretanto quando observamos a resposta da FC após microinjeção central não houve diferenças em nenhum momento do registro (figura D).

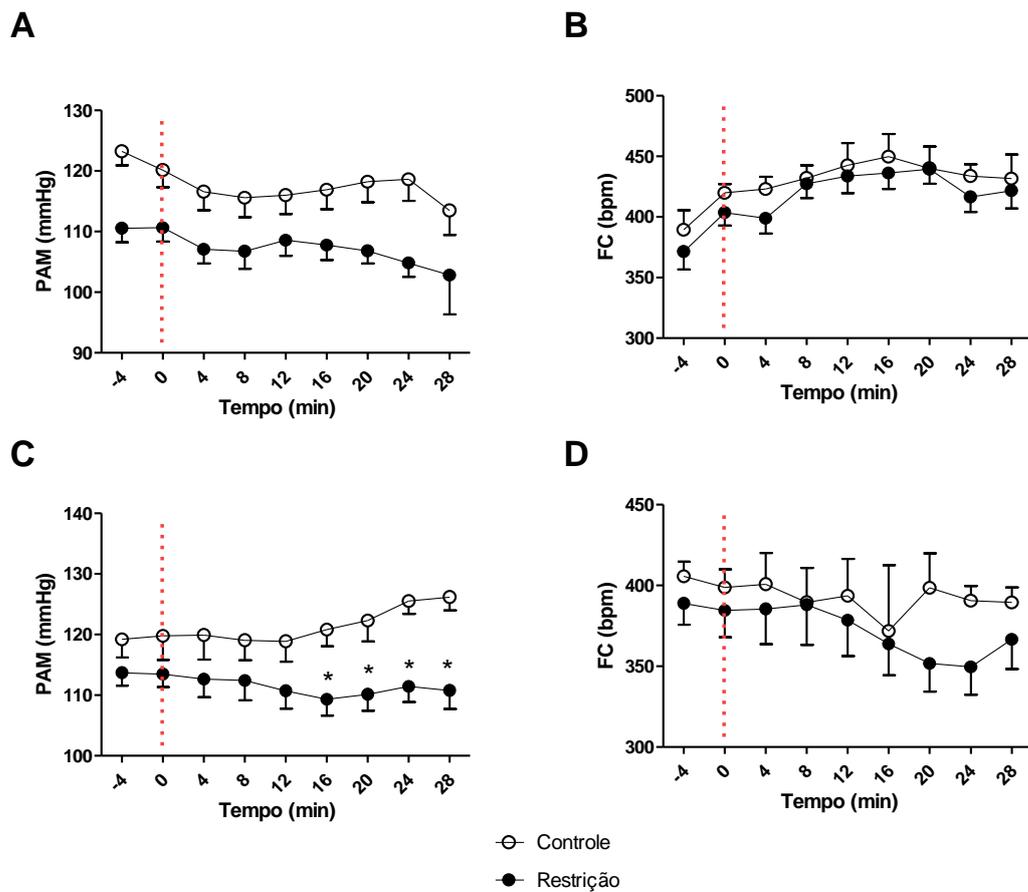


Figura 29: Perfil da resposta após bloqueio dos receptores AT1. Gráficos referentes às variações da pressão arterial e frequência cardíaca no decorrer do registro após infusão endovenosa (A e B) e microinjeção intracerebroventricular (C e D) de losartan em ratas submetidas à restrição alimentar.* Diferença estatística entre controle e RA no tempo determinado; ANOVA two way com pós-teste de Bonferroni, ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que o modelo de restrição alimentar foi eficiente em gerar alterações bioquímicas e fisiológicas semelhantes as que ocorrem na anorexia nervosa. Além disso, a restrição alimentar diminuiu a concentração de óxido nítrico plasmático, aumentou a atividade simpática no vaso e aumentou a responsividade do reflexo Bezold-Jarisch. No sistema renina angiotensina, ocorreu uma resposta pressora reduzida após infusão de Ang II nos animais submetidos à restrição alimentar e um aumento da responsividade após infusão de angiotensina I que foi dependente de ECA. Juntamente com esses resultados observamos uma resposta hipotensora maior após bloqueio dos receptores AT1 na restrição alimentar.

A restrição alimentar em animais é considerado um modelo experimental para estudo da AN muito utilizado e reconhecido pela literatura (Hagan e cols., 2002; Siegfried e cols., 2003). O modelo utilizado consistiu na redução de 60% na quantidade dos nutrientes e calorias oferecidos às ratas durante 14 dias. Neste trabalho optamos por trabalhar com fêmeas pela prevalência de anorexia nervosa ser maior entre mulheres (Smink e cols., 2012) e por saber que alterações como resistência à insulina, pressão arterial e transmissão sináptica podem ser influenciadas pela variação hormonal (Camporez e cols., 2013; McCaffrey & Czaja, 1989; Wojtowicz e cols., 2008). Após 14 dias de restrição alimentar observamos que a mesma causou uma redução no peso dos animais em aproximadamente 15% (figura 12), o que é muito semelhante ao observado em trabalhos que utilizam esse protocolo na mesma porcentagem de privação de nutrientes (Marinkovic e cols., 2007; Carr e cols., 1998). Após a avaliação do ciclo estral, observamos que o grupo controle teve uma distribuição de frequência homogênea, e que os animais com restrição alimentar permanecem mais tempo na fase do metaestro e diestro, sendo estes observados com mais frequência na última semana da dieta (dados observacionais) (figura 13). Sabe-se que essas fases são consideradas não férteis e possuem diminuição significativa nas concentrações de estradiol plasmático. Essa aciclicidade observada nesses animais é descrita na literatura em experimentos com

restrição alimentar (Cooper e cols., 1970) e este mesmo fato é comum na anorexia (Mendelsohn & Warren, 2010; Bates e cols., 1982). Evolutivamente, esta é uma resposta do organismo na tentativa de evitar prenhes em períodos de estresse por carência alimentar (Surbey, 1987), isso porque esse estado necessita de alta demanda energética. Fisiologicamente, também ocorre uma alteração no eixo hipotálamo-hipófise-ovariano. A ovulação depende da liberação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo médio-basal e da sua ação na hipófise através do sistema porta-hipofisário. Em consequência, há liberação do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo estimulante (FSH) (Chan & Mantzoros, 2005). Porém na carência nutricional há supressão da secreção de GnRH pelo hipotálamo, assim não ocorre a menstruação em mulheres ou o ciclo estral em ratas (Lawson & Klibanski, 2008). Vale ressaltar que todos os parâmetros bioquímicos e fisiológicos avaliados não sofreram influência das variações hormonais observadas nas diferentes fases estrais.

Como descrito anteriormente na tabela 1, após as dosagens bioquímicas os animais com restrição alimentar apresentaram diminuições significativas nas concentrações plasmáticas de creatinina, albumina, AST, colesterol total e colesterol LDL. No entanto, ureia e glicose aumentaram a concentração plasmática após a restrição alimentar. Hemoglobina, fosfatase alcalina, proteínas totais, ALT, triglicérides e colesterol HDL não alteraram. A albumina é uma proteína sintetizada pelo fígado e muito utilizada para determinação da desnutrição (Beghetto e cols., 2009). Sua síntese depende dos níveis séricos de hormônios (corticosteróides, esteróides anabólicos e tiroxina) e pode ser inibida na presença de citocinas pró-inflamatórias e alterações no estado nutricional, incluindo aí, a disponibilidade de energia, proteínas e micronutrientes (dos Santos e cols., 2003). Ureia e creatinina são consideradas marcadores da função renal. A ureia é formada no fígado a partir da amônia e excretada pelo rim. Já a creatinina é um produto do metabolismo muscular e, assim como a ureia, é excretada pelo rim. Um aumento na concentração da ureia plasmática com uma diminuição na concentração de creatinina está relacionado com alto catabolismo proteico (Baum e cols., 1975). O fígado também possui diversos marcadores de funcionamento, entre eles a alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). AST é encontrada no

fígado, músculo esquelético e cardíaco, rim, cérebro, pâncreas, pulmão, leucócitos e eritrócitos. Já a ALT é mais específica no fígado (Lee e cols., 2012). Sabe-se que para a síntese dessas enzimas é necessária a coenzima piridoxal-5-fosfato (B6) (Rossouw e cols., 1978), sendo a AST mais sensível à deficiência de B6 (Cheung & Briggs, 1974).

Contudo, em uma visão geral, percebe-se que os animais com restrição alimentar estão em um processo de desnutrição demonstrado pela diminuição da albumina e um alto catabolismo proteico, segundo alterações de ureia e creatinina. Nossos resultados vão de acordo com alguns trabalhos que relatam serem as principais alterações na anorexia nervosa a hipoalbuminemia (Yap e cols., 1975) e aumento de ureia e diminuição da creatinina plasmática (Winston, 2012). Além dessas alterações, a restrição alimentar ocasiona uma possível deficiência de B6 demonstrada pelos valores diminuídos da AST. As enzimas hepáticas são muito variáveis entre os pacientes com anorexia nervosa, podendo encontrar estudos que relatam valores tanto baixos quanto altos (Winston, 2012). Já no metabolismo lipídico nossos resultados estão em concordância com o trabalho de Case e colaboradores (Case e cols., 1999a) onde encontraram uma diminuição do colesterol total e LDL e controversos com outros trabalhos que descrevem casos de anorexia sem alterações no colesterol (Curatola e cols., 2004) ou com hipercolesterolemia (Matzkin e cols., 2006). O quadro de hiperglicemia desenvolvido na restrição alimentar também é encontrado na anorexia nervosa e pode ser explicada como decorrente da resistência à insulina desenvolvida pela lipodistrofia existente nesses pacientes. Estudos demonstram que pacientes anoréxicos possuem diminuição da gordura subcutânea assim como um aumento do depósito de gordura visceral e intramuscular, sendo esta, altamente relacionada com a resistência à insulina (Case e cols., 1999b). Além da lipodistrofia, outro fator que contribui para o aumento da glicose é o possível aumento na produção do cortisol. Esse aumento de cortisol circulante é muito comum na anorexia (Oskis e cols., 2012) e está relacionado ao estresse que dietas hipocalóricas geram no organismo (Tomiya e cols., 2010). Assim, diante dos resultados, podemos dizer que a restrição alimentar ocasionou alterações bioquímicas similares a que ocorrem na anorexia nervosa.

Sabendo que a restrição alimentar foi capaz de diminuir o peso dos animais e gerar um catabolismo proteico, avaliamos os órgãos desses animais para verificar se a alta demanda proteica poderia afetar o peso dos órgãos vitais. Após analisar o peso dos tecidos, descritos nas tabelas 2-5, observamos que a restrição alimentar diminuiu o peso úmido absoluto do coração, rim e fígado, porém na análise do peso úmido relativo a 100 gramas de peso corporal, os pesos dos tecidos se igualaram aos do controle. Em relação ao cérebro, seu peso úmido absoluto não foi diferente, entretanto seu peso úmido relativo foi maior na restrição. Um item que deve ser ressaltado é que os animais em experimentação eram adultos, ou seja, seu crescimento estava completo. Assim, levando isso em consideração, a diminuição no peso dos animais em duas semanas não deveria afetar o peso dos órgãos vitais, principalmente do coração e do rim. Em uma situação hipotética, se o peso corporal diminuísse e os pesos absolutos dos tecidos permanecessem sem alterar, quando realizarmos o peso relativo, haveria um aumento no peso dos órgãos nos animais com restrição alimentar, como exemplificado pelo cérebro. Onde na realidade o cérebro não é maior, mas sim o peso do animal que foi menor. Pensando dessa forma, a diminuição no peso úmido absoluto do coração, rim e fígado, mesmo depois sem diferença no peso relativo, já demonstra uma diminuição no tamanho do órgão. Essa diminuição no peso demonstra que o catabolismo proteico foi tão intenso que pode ter degradado proteínas, principalmente do coração e do rim, pois o fígado, seu peso pode ter sido alterado pela diminuição no estoque de glicogênio. Posteriormente, avaliamos o peso seco dos tecidos para verificar possível existência de edema. Na avaliação do peso seco absoluto, coração, rim, fígado e pulmão apresentaram uma diminuição significativa nos animais submetidos à restrição alimentar. Porém no peso seco relativo somente o fígado permaneceu com o peso reduzido. Esses dados caracterizam mais uma vez a real diminuição no peso desses tecidos após a restrição alimentar. Em relação ao pulmão e ao cérebro dos animais com restrição alimentar, estes apresentaram uma redução no peso seco que não existia no peso úmido, o que pode ser característico da presença de edema. Na anorexia não existem trabalhos que relatam os pesos dos órgãos na anorexia, porém alguns trabalhos demonstram algumas alterações nos órgãos que podem gerar alterações nos pesos como hipotrofia ventricular (Ishizawa e cols., 2008),

perda de miofibrilas, destruição do miocárdio e edema pulmonar (Turillazzi e cols., 2012).

Após avaliar o perfil bioquímico e o efeito do catabolismo nos tecidos, avaliamos a parte fisiológica. Primeiramente, observamos a PAM e FC basais, as quais após a restrição alimentar apresentaram uma diminuição significativa. Estes dados demonstrados na figura 14 estão de acordo com os resultados de trabalhos que estudam a restrição alimentar (McKnight e cols., 1999; Pinotti e cols., 2010; Ishizawa e cols., 2008). Estudos com anorexia nervosa também relatam uma diminuição na PAM e FC (De e cols., 1994; Ishizawa e cols., 2008), porém a causa dessa alteração pode ser multifatorial, desde hipovolemia (Bouquegneau e cols., 2012), alterações cardíacas (Casiero & Frishman, 2006; Vazquez e cols., 2003) ou ainda disfunções nos reflexos que controlam a PA.

Diante dos resultados bioquímicos e fisiológicos apresentados, podemos inferir que o modelo de restrição alimentar foi adequado e eficiente para gerar alterações similares as que ocorrem na anorexia. E sabendo que a restrição alimentar, assim como a anorexia, altera o sistema cardiovascular gerando hipotensão e bradicardia, propomos investigar os sistemas envolvidos na regulação da pressão arterial.

O primeiro componente avaliado foi o óxido nítrico (NO) (figura 15). Após a dosagem plasmática do mesmo observamos uma diminuição na concentração de NO plasmático em relação ao controle. Levando em consideração que a restrição alimentar causa hipotensão nos animais, pode-se sugerir que essa diminuição no óxido nítrico plasmático ocorre como uma resposta compensatória à diminuição da pressão arterial, que gera menor cisalhamento no vaso, e dessa forma impede uma redução excessiva da pressão arterial. Para entender melhor o mecanismo envolvido na redução do NO realizamos experimentos nos quais bloqueamos a enzima conversora de NO, através da infusão endovenosa de L-NAME. Os resultados obtidos não apresentaram diferenças nas respostas pressora e bradicardica (figura 16). Esse resultado sugere que a atividade da NOS está normal, porém não sabemos se a disponibilidade de L-arginina é igual e por isso há menos NO circulante. Seriam necessárias maiores investigações neste item, para compreendermos o que diminui o óxido nítrico plasmático. Estudos em pacientes

anoréxicos encontraram redução no óxido nítrico plasmático, semelhante aos nossos resultados, e ao mesmo tempo encontraram diminuição da L-arginina circulante e da atividade da óxido nítrico sintase (Rodrigues e cols., 2010), o que é relacionada à ingestão insuficiente de proteínas.

Sabe-se que no organismo existem reflexos que controlam a pressão arterial momento-a-momento. Estudos com animais desnutridos demonstram que a ausência de uma alimentação equilibrada e insuficiente pode afetar a sensibilidade e a resposta desses reflexos (Bezerra e cols., 2011; Penitente e cols., 2007; Tropia e cols., 2001). Isso demonstra que eles são passíveis de alteração em seus funcionamentos frente à inadequação de nutrientes. Assim, testamos diversos reflexos para verificar a influencia da restrição alimentar nos mesmos. Quando avaliamos o quimiorreflexo através da infusão de cianeto de potássio, os animais com restrição alimentar apresentaram uma resposta pressora e bradicárdica similar ao controle (figura 17). Esse reflexo é amplamente conhecido por sua sensibilidade a alterações de pCO_2 , pO_2 e pH e dessa forma controla a pressão arterial, porém não existem relatos na literatura associando esse reflexo com a restrição alimentar ou mesmo com a anorexia. Outro reflexo avaliado foi o barorreflexo através da infusão endovenosa em rampa de fenilefrina e nitroprussiato de sódio. Nos experimentos realizados em nosso laboratório a restrição alimentar não causou alterações no ganho e na curva das funções barorreflexas (figura 19). Esse reflexo é ativado por deformações mecânicas no vaso que geram uma resposta compensatória na frequência cardíaca. Nossos resultados foram contrários aos apresentados na literatura onde há um aumento do ganho barorreflexo em pacientes com anorexia (Ishizawa e cols., 2008; Jacoangeli e cols., 2013). Essa diferença observada pode ser justificada pela utilização de protocolos diferentes, pois utilizamos manobras farmacológicas que não são possíveis de realizar em humanos e as técnicas utilizadas em humanos são por vias indiretas, como análise espectral ou por análise da pressão arterial diante modificações posturais. Além da utilização de métodos diferentes, também há a diferença da espécie utilizada (humanos e ratos) e os trabalhos não relatam o tempo que os pacientes eram anoréxicos, ou seja, o tempo de restrição alimentar pode ser diferente do empregado nesse trabalho.

O terceiro reflexo estudado foi o reflexo Bezold-Jarisch através da infusão endovenosa de fenilbiguanida. Após a realização dos testes os animais submetidos à restrição alimentar apresentaram uma resposta hipotensora mais acentuada e uma resposta bradicárdica similar ao controle (figura 18). Esse reflexo atua no controle da pressão arterial através de mecanorreceptores ou quimiorreceptores localizados nas câmaras cardíacas e no pulmão induzindo uma resposta de hipotensão, bradicardia e apneia. Baseando no funcionamento desses receptores, onde possuem aferências vagais e posteriormente desenvolvem inibição simpática (Longhurst, 1984), podemos inferir que a restrição alimentar ocasiona um provável aumento na sensibilidade do componente simpático do reflexo Bezold-Jarisch.

O sistema nervoso simpático é outro mecanismo muito utilizado pelo organismo, pois exerce fortes influências no controle da pressão arterial. O funcionamento desse sistema pode ser prejudicado diante privações nutricionais, como proteínas (Gomide e cols., 2013 ; Martins e cols., 2011), vitamina B12 (Sucharita e cols., 2012) e vitamina E (Ralevic e cols., 1995). Considerando que as alterações encontradas no reflexo Bezold-Jarisch podem refletir em alterações no sistema nervoso simpático, avaliamos indiretamente o sistema nervoso simpático via receptores α_1 e β adrenérgicos. Após o bloqueio dos receptores α_1 adrenérgicos com prazosin, no grupo com restrição alimentar ocorreu uma hipotensão mais acentuada quando comparamos com o controle juntamente com uma resposta taquicárdica mais pronunciada (figura 20). Essa hipotensão acentuada gerou um aumento no pré-carga que promoveu um aumento reflexo na FC. Isso ocorre porque as catecolaminas que se ligariam nos receptores α_1 adrenérgicos ficam disponíveis na circulação e se ligam nos receptores β_1 cardíacos, causando desse modo, uma estimulação residual (Goodman e Gilman, 2005).

Também avaliamos os receptores β adrenérgicos, porém com a infusão de propranolol, um β bloqueador não específico. Após o bloqueio farmacológico destes receptores, os animais submetidos à restrição alimentar apresentaram uma resposta pressora menor que o controle e a mesma amplitude de bradicardia (figura 21). Sabe-se que os receptores β_1 localizam-se no coração e quando ativados promovem contração do músculo cardíaco e os receptores β_2 localizam-se no músculo liso e estão associados a vasodilatação. Já os receptores β_3 localizam-se

no tecido adiposo e após ativação, eles promovem a lipólise. Quando infundimos propranolol, este inibiu tanto os receptores β_1 quanto os β_2 , causando bradicardia e vasoconstrição, respectivamente. Porém, na restrição alimentar a resposta pressora foi menor provavelmente porque quando inibimos os receptores β_2 as catecolaminas disponíveis ativaram os receptores α_1 . Entretanto, como demonstrado no experimento anterior, os receptores α_1 já estão hiperativos na restrição alimentar. Diante disso, fica impossível estimular mais estes receptores, e como consequência a resposta pressora na restrição alimentar foi menor que no controle. Em relação aos receptores β_1 , estes estão com a responsividade normal, demonstrada pela resposta bradicárdica similar em ambos os grupos. Assim, o avaliar os experimentos realizados nos receptores α_1 e β adrenérgicos, podemos inferir que a restrição alimentar aumenta a atividade simpática no vaso sem alterações na responsividade simpática cardíaca. Landsberg, 2006, descreve em seu trabalho que o sistema nervoso simpático pode estar aumentado na RA porque nesse modelo há um aumento na mobilização de catecolaminas. Outro fator que pode ocasionar esse aumento na atividade simpática é pelo fato da privação de alimentos ser considerada um fator estressante (Pankevich e cols., 2010). Tomiyama e cols., 2010, demonstraram que dietas hipocalóricas ocasionam um aumento no cortisol circulante e este por sua vez é considerado um biomarcador do estresse (Benfield e cols., 2013) que influencia no controle do sistema nervoso autônomo (McCarty e cols., 1988). Contudo, podemos inferir que o aumento na atividade simpática após a restrição alimentar pode ser decorrente do aumento no cortisol circulante ou do aumento de catecolaminas circulantes, ou ambos.

Sabe-se que o sistema nervoso simpático sofre influência do sistema renina angiotensina (SRA) (Reid, 1992) e que este, pode influenciar nos valores da pressão arterial (de e cols., 2000; Kannan e cols., 1991). Deste modo, avaliamos o SRA para melhor compreensão dos distúrbios decorrentes da restrição alimentar. Os animais com restrição alimentar apresentaram uma resposta pressora maior que a observada no grupo controle após infusão de Ang I (20ng). Entretanto, após a estimulação com BK (1,0 μ g) os animais com restrição apresentaram uma resposta pressora enquanto o controle teve uma resposta hipotensora (figura 22). Em uma segunda etapa do experimento bloqueamos a enzima conversora de angiotensina

(ECA) com captopril, o qual não modificou a PAM e FC de ambos os grupos (figura 23). Após infusão do captopril esperamos 10 min. e reinfundimos Ang I e BK. A Ang I infundida após a inibição da ECA teve sua resposta abolida e semelhante à resposta observada no controle, assim como a alteração da FC (figura 24 B). Em relação à BK infundida após a inibição da ECA, observamos que o grupo com restrição apresentou uma resposta hipotensora igual a do controle, assim como a resposta taquicardica (figura 24 A). Esses resultados demonstram que a ECA foi essencial no desenvolvimento das respostas da AngI e BK nos animais com restrição. Além disso, provavelmente a atividade da ECA está aumentada. Ou seja, com a ação da ECA aumentada, há mais degradação de bradicinina, justificando desse modo, a resposta hipotensora somente após a infusão de captopril. Essa ação aumentada da ECA também pode estar relacionada ao aumento da resposta pressora nos animais restritos, com possível aumento da conversão de Ang I para Ang II. Vale ressaltar que não fizemos atividade enzimática da ECA, portanto não sabemos se sua atividade está realmente aumentada. Serão necessários mais experimentos para comprovarmos essa hipótese.

A partir da identificação de possíveis problemas no sistema renina angiotensina, decidimos investigar um pouco mais sobre o assunto. Sendo assim, avaliamos as respostas cardiovasculares dos animais com restrição alimentar mediante estimulação e inibição dos receptores de angiotensina. No primeiro experimento infundimos periféricamente e microinjetamos angiotensina II icv. As respostas após estimulação central e periférica foram semelhantes, e para nossa surpresa, os animais com restrição alimentar apresentaram uma resposta pressora reduzida quando comparado com controle e sem alterações na variação da FC (figura 25). Quando realizamos a comparação da variação da PAM e FC no decorrer do tempo, somente a curva da PAM após microinjeção icv foi diferente (figura 26), porém vale ressaltar que a análise do delta foi realizada com o valor médio da PAM e FC nos três min. seguintes da infusão de AngII e o teste de comparação foram diferentes. Na tentativa de entender se haveria alterações na quantidade de Ang II realizamos um segundo experimento, o qual dosou a concentração plasmática de Ang II e após a análise, não houve diferença entre controle e restrição (figura 27). Apesar de não ter ocorrido diferença entre os grupos nessa dosagem, não podemos

inferir que o mesmo acontece nos tecidos. Por causa da regulação do sistema renina angiotensina ocorrer localmente, a concentração de AngII e seus metabolitos ativos podem variar entre os tecidos e pode ser maior em microvasos que no plasma, segundo Danser, 2003 . Estudos com pacientes com anorexia relatam haver um aumento de renina circulante e ao mesmo tempo após infusão venosa de Ang II, estes pacientes apresentam uma resposta pressora reduzida quando comparada com a resposta controle (Mizuno e cols., 1993).

Após esse experimento realizamos um terceiro teste, porém com o bloqueio dos receptores AT1 a partir da microinjeção icv e periférica de losartan. Na avaliação cardiovascular não houve diferença na variação da pressão arterial e frequência cardíaca no teste periférico, porém no teste central houve uma resposta hipotensora mais acentuada nos animais submetidos à restrição alimentar sem alterações significativas na frequência cardíaca (figura 28). Na avaliação da variação das respostas em relação ao tempo, observamos que a resposta hipotensora após bloqueio central aconteceu a partir do 16º minuto (figura 29). Isso aconteceu, provavelmente, porque microinjetamos o losartan no ventrículo lateral, onde não teve efeito significativo na PAM. Posteriormente a droga deve ter se deslocado juntamente com o líquido cefalorraquidiano até atingir regiões neuronais com maiores concentrações de receptores AT1 e que possuem influência no controle cardiovascular.

Com esse experimento podemos concluir que há um aumento na atividade do sistema renina angiotensina nos animais com restrição alimentar. Esse aumento da atividade do SRA pode ser derivado do aumento na atividade constitutiva dos receptores AT1 não necessariamente dependente de Ang II. É bem descrito e aceito na literatura que os receptores AT1 possuem atividade constitutiva (Akazawa e cols., 2009; Petrel & Clauser, 2009), sendo uma das formas conhecidas de ativação a estimulação através de estresse mecânico que resulta na ativação da cascata de sinalização independente da presença de seu ligante. Porém, sabemos que há um aumento na atividade do sistema renina angiotensina e que a resposta pressora da Ang I é dependente de ECA, mas provavelmente não via Ang II. Assim, inferimos outra possibilidade do aumento da atividade do sistema nervoso simpático. Esse aumento pode ser através da ligação da Ang III no receptor AT1. Estudos avaliaram

a resposta pressora desenvolvida pela Ang II e Ang III microinjetada intracerebroventricular e demonstraram que no sistema nervoso central a Ang III é o principal agente pressor, via receptor AT1 (Rozenfeld e cols., 2003; Reaux e cols., 1999). Ao mesmo tempo, sabemos que a Ang I pode ser convertida em Ang III pela ação da ECA e a Ang II é convertida em Ang III através da ação da aminopeptidase A (Unger e cols., 2011). Goto e cols., 2006, demonstraram que a afinidade da AMPA pela Ang II é diminuída na ausência de cálcio e que Ang IV pode se ligar a AMPA inibindo-a. Contudo, sabendo que a restrição alimentar priva o animal de diversos nutrientes, questionamos se a dieta influenciou na atividade da AMPA através da possível disponibilidade diminuída de cálcio, ou na própria estrutura da enzima, ou ainda pela inibição competitiva com a Ang IV.

Assim, é possível sugerir que a restrição alimentar ocasiona disfunção na ação da AMPA e como consequência dessa disfunção há aumento da conversão da Ang I em Ang III através da ação da ECA e consequente aumento da ativação do receptor AT1.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados encontrados podemos concluir que o modelo de restrição alimentar de 60% por 14 dias foi eficiente em gerar alterações fisiológicas e bioquímicas semelhantes às existentes em paciente com anorexia como: diminuição do peso corporal, anastro, diminuição de albumina, ureia, colesterol total e LDL, AST, aumento de creatinina e glicose e diminuição na pressão arterial e frequência cardíaca. Em relação aos sistemas que controlam a pressão arterial, a restrição alimentar diminui a concentração do óxido nítrico circulante, independente da ação da óxido nítrico sintase, aumentou a responsividade pressora do reflexo Bezold-Jarisch, juntamente com aumento da atividade simpática no vaso. Já na atividade do sistema renina angiotensina sugere-se um aumento da atividade no sistema nervoso central dependente da ECA, Ang I e AT1. Desse modo, podemos concluir que, com o objetivo de garantir a perfusão tecidual adequada na restrição alimentar como compensação da hipotensão e bradicardia há hiperatividade de diversos sistemas que possuem influência na pressão arterial (figura 30).

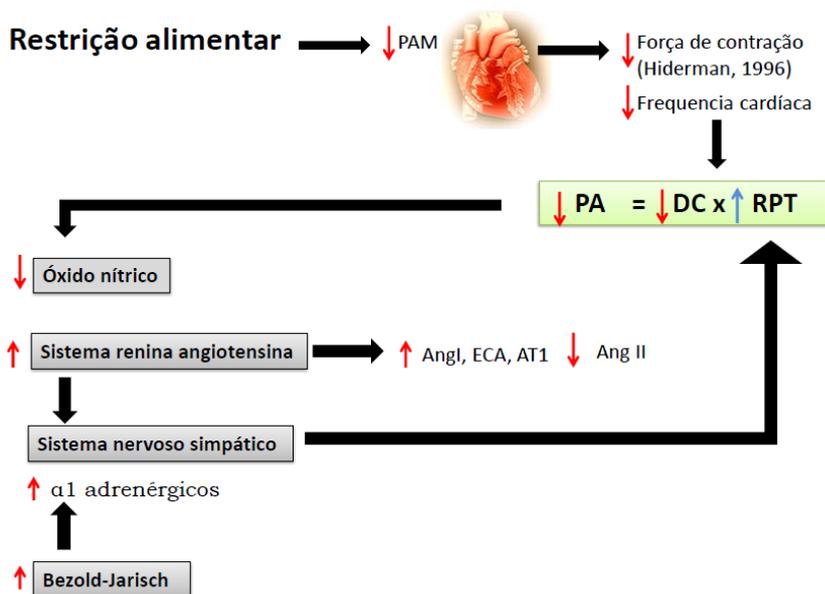


Figura 30: Esquema dos resultados obtidos em ratas submetidas à restrição alimentar. (PA: pressão arterial, DC: débito cardíaco, RPT: resistência periférica total).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLQUIST R.P. (1979) Adrenergic receptors and others. Fourteenth Annual Becton, Dickinson and Company Oscar Schwidetzky Memorial Lecture. *Anesth.Analg.* **58**, 510-515.
- AHLQUIST R.P. (1980) Historical perspective. Classification of adrenoreceptors. *J.Auton.Pharmacol.* **1**, 101-106.
- AKAZAWA H., YASUDA N. & KOMURO I. (2009) Mechanisms and functions of agonist-independent activation in the angiotensin II type 1 receptor. *Mol.Cell Endocrinol.* **302**, 140-147.
- BATES G.W., BATES S.R. & WHITWORTH N.S. (1982) Reproductive failure in women who practice weight control. *Fertil.Steril.* **37**, 373-378.
- BAUM N., DICHOSO C.C. & CARLTON C.E. (1975) Blood urea nitrogen and serum creatinine. Physiology and interpretations. *Urology* **5**, 583-588.
- BEGHETTO M.G., LUFT V.C., MELLO E.D. & POLANCZYK C.A. (2009) Accuracy of nutritional assessment tools for predicting adverse hospital outcomes. *Nutr.Hosp.* **24**, 56-62.
- BENFIELD R.D., NEWTON E.R., TANNER C.J. & HEITKEMPER M.M. (2013) Cortisol as a Biomarker of Stress in Term Human Labor: Physiological and Methodological Issues. *Biol.Res.Nurs.*
- BEZERRA V.M., XAVIER C.H., DE MENEZES R.C., FONTES M.A., CARDOSO L.M., FERNANDES L.G. & CHIANCA D.A., Jr. (2011) Bezold-Jarisch reflex in sino-aortic denervated malnourished rats. *Auton.Neurosci.* **162**, 48-53.
- BOUQUEGNEAU A., DUBOIS B.E., KRZESINSKI J.M. & DELANAYE P. (2012) Anorexia nervosa and the kidney. *Am.J.Kidney Dis.* **60**, 299-307.
- CAMPBELL D.J. (2003) The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **35**, 784-791.
- CAMPOREZ J.P., JORNAYVAZ F.R., LEE H.Y., KANDA S., GUIGNI B.A., KAHN M., SAMUEL V.T., CARVALHO C.R., PETERSEN K.F., JURCZAK M.J. & SHULMAN G.I. (2013) Cellular Mechanism by Which Estradiol Protects Female Ovariectomized Mice from High-Fat Diet-Induced Hepatic and Muscle Insulin Resistance. *Endocrinology*
- CARR K.D., PARK T.H., ZHANG Y. & STONE E.A. (1998) Neuroanatomical patterns of Fos-like immunoreactivity induced by naltrexone in food-restricted and ad libitum fed rats. *Brain Res.* **779**, 26-32.
- CARROLL J.L. & KIM I. (2012) Carotid chemoreceptor "resetting" revisited. *Respir.Physiol Neurobiol.*
- CASE T., LEMIEUX S., KENNEDY S.H. & LEWIS G.F. (1999a) Elevated plasma lipids in patients with binge eating disorders are found only in those who are anorexic. *Int.J.Eat.Disord.* **25**, 187-193.

- CASE T., LEMIEUX S., KENNEDY S.H. & LEWIS G.F. (1999b) Elevated plasma lipids in patients with binge eating disorders are found only in those who are anorexic. *Int.J.Eat.Disord.* **25**, 187-193.
- CASIERO D. & FRISHMAN W.H. (2006) Cardiovascular complications of eating disorders. *Cardiol.Rev.* **14**, 227-231.
- CHAN J.L. & MANTZOROS C.S. (2005) Role of leptin in energy-deprivation states: normal human physiology and clinical implications for hypothalamic amenorrhoea and anorexia nervosa. *Lancet* **366**, 74-85.
- CHEUNG T. & BRIGGS M.H. (1974) Pyridoxal phosphate and the measurement of aminotransferase activity. *Clin.Chim.Acta* **54**, 127-129.
- CLELAND S.J. & REID J.L. (1996) The renin-angiotensin system and the heart: a historical review. *Heart* **76**, 7-12.
- COOPER K.J., HAYNES N.B. & LAMMING G.E. (1970) Effects of unrestricted feeding during oestrus on reproduction in the underfed female rat. *J.Reprod.Fertil.* **22**, 293-301.
- CURATOLA G., CAMILLONI M.A., VIGNINI A., NANETTI L., BOSCARO M. & MAZZANTI L. (2004) Chemical-physical properties of lipoproteins in anorexia nervosa. *Eur.J.Clin.Invest* **34**, 747-751.
- DANSER A.H. (2003) Local renin-angiotensin systems: the unanswered questions. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **35**, 759-768.
- DAS S. & KUMAR K.N. (1995) Nitric oxide: its identity and role in blood pressure control. *Life Sci.* **57**, 1547-1556.
- DE G.M., CATT K.J., INAGAMI T., WRIGHT J.W. & UNGER T. (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol.Rev.* **52**, 415-472.
- DE S.G., SCALFI L., GALDERISI M., CELENTANO A., DI B.G., TAMMARO P., GAROFALO M., MUREDDU G.F., DE D.O. & CONTALDO F. (1994) Cardiac abnormalities in young women with anorexia nervosa. *Br.Heart J.* **71**, 287-292.
- DOS SANTOS N.S.J., DRAIBE S.A., KAMIMURA M.A., CANZIANI M.E.F., CENDOROGLIO M., JUNIOR A.G. & CUPPARI L. (2003) Is serum albumin a marker of nutritional status in hemodialysis patients without evidence of inflammation? *Artificial Organs* **27**, 681-686.
- ENQUIST J., SKRODER C., WHISTLER J.L. & LEEB-LUNDBERG L.M. (2007) Kinins promote B2 receptor endocytosis and delay constitutive B1 receptor endocytosis. *Mol.Pharmacol.* **71**, 494-507.
- FORSTERMANN U., GATH I., SCHWARZ P., CLOSS E.I. & KLEINERT H. (1995) Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochem.Pharmacol.* **50**, 1321-1332.
- FRANCO M.C., ARRUDA R.M., DANTAS A.P., KAWAMOTO E.M., FORTES Z.B., SCAVONE C., CARVALHO M.H., TOSTES R.C. & NIGRO D. (2002) Intrauterine undernutrition: expression and activity of

- the endothelial nitric oxide synthase in male and female adult offspring. *Cardiovasc.Res.* **56**, 145-153.
- GOMIDE J.M., DE MENEZES R.C., FERNANDES L.G., SILVA F.C., CARDOSO L.M., MIRANDA P.H., DA SILVA L.G., LIMA M.P., PESQUERO J.L., FOUREAUX G., FERREIRA A.J. & CHIANCA-JR D.A. (2013a) 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* **98**, 57-66.
- GOMIDE J.M., DE MENEZES R.C., FERNANDES L.G., SILVA F.C., CARDOSO L.M., MIRANDA P.H., DA SILVA L.G., LIMA M.P., PESQUERO J.L., FOUREAUX G., FERREIRA A.J. & CHIANCA-JR D.A. (2013b) 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* **98**, 57-66.
- GOTO Y., HATTORI A., ISHII Y., MIZUTANI S. & TSUJIMOTO M. (2006) Enzymatic properties of human aminopeptidase A. Regulation of its enzymatic activity by calcium and angiotensin IV. *J.Biol.Chem.* **281**, 23503-23513.
- GUIMARAES S. & MOURA D. (2001) Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol.Rev.* **53**, 319-356.
- GUYENET P.G. (2006) The sympathetic control of blood pressure. *Nat.Rev.Neurosci.* **7**, 335-346.
- HAGAN M.M., WAUFORD P.K., CHANDLER P.C., JARRETT L.A., RYBAK R.J. & BLACKBURN K. (2002) A new animal model of binge eating: key synergistic role of past caloric restriction and stress. *Physiol Behav.* **77**, 45-54.
- HEYMANS C. (1958) Baroreceptor and chemoceptor reflexes in monkeys. *Circ.Res.* **6**, 567-569.
- HIGUCHI S., MORGAN D.A. & MARK A.L. (1988) Contrasting reflex effects of chemosensitive and mechanosensitive vagal afferents. *Hypertension* **11**, 674-679.
- HILDERMAN T., MCKNIGHT K., DHALLA K.S., RUPP H. & DHALLA N.S. (1996) Effects of long-term dietary restriction on cardiovascular function and plasma catecholamines in the rat. *Cardiovasc.Drugs Ther.* **10 Suppl 1**, 247-250.
- ISHIZAWA T., YOSHIUCHI K., TAKIMOTO Y., YAMAMOTO Y. & AKABAYASHI A. (2008) Heart rate and blood pressure variability and baroreflex sensitivity in patients with anorexia nervosa. *Psychosom.Med.* **70**, 695-700.
- JACOANGELI F., MEZZASALMA F.S., CANTO G., JACOANGELI F., COLICA C., DE L.A. & IELLAMO F. (2013) Baroreflex sensitivity and heart rate variability are enhanced in patients with anorexia nervosa. *Int.J.Cardiol.* **162**, 263-264.
- JANIG W. & MCLACHLAN E.M. (1992) Specialized functional pathways are the building blocks of the autonomic nervous system. *J.Auton.Nerv.Syst.* **41**, 3-13.
- JUNG J., NA C. & HUH Y. (2012) Alterations in nitric oxide synthase in the aged CNS. *Oxid.Med.Cell Longev.* **2012**, 718976

- KANNAN H., NAKAMURA T., JIN X.J., HAYASHIDA Y. & YAMASHITA H. (1991) Effects of centrally administered angiotensin on sympathetic nerve activity and blood flow to the kidney in conscious rats. *J.Auton.Nerv.Syst.* **34**, 201-210.
- KRAMMER E.B. (1978) Carotid body chemoreceptor function: hypothesis based on a new circuit model. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **75**, 2507-2511.
- KRAYER O. (1961) The history of the Bezold-Jarisch effect. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Exp.Pathol.Pharmakol.* **240**, 361-368.
- LANDSBERG L. (2006) Feast or famine: the sympathetic nervous system response to nutrient intake. *Cell Mol.Neurobiol.* **26**, 497-508.
- LAWSON E.A. & KLIBANSKI A. (2008) Endocrine abnormalities in anorexia nervosa. *Nat.Clin.Pract.Endocrinol.Metab* **4**, 407-414.
- LEE T.H., KIM W.R. & POTERUCHA J.J. (2012) Evaluation of elevated liver enzymes. *Clin.Liver Dis.* **16**, 183-198.
- LEEB-LUNDBERG L.M., MARCEAU F., MULLER-ESTERL W., PETTIBONE D.J. & ZURAW B.L. (2005) International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol.Rev.* **57**, 27-77.
- LONGHURST J.C. (1984) Cardiac receptors: their function in health and disease. *Prog.Cardiovasc.Dis.* **27**, 201-222.
- MAIS'KYI V.O., PILIAVS'KYI O.I., MAZNYCHENKO A.V., DATSENKO V.V., PAVLIUCHENKO V.B., KOSTIUKOV O.I. & MOIBENKO O.O. (2005) [Central neuronal pathways in the Bezold-Jarisch reflex in rats]. *Fiziol.Zh.* **51**, 24-38.
- MARINKOVIC P., PESIC V., LONCAREVIC N., SMILJANIC K., KANAZIR S. & RUZDIJIC S. (2007) Behavioral and biochemical effects of various food-restriction regimens in the rats. *Physiol Behav.* **92**, 492-499.
- MARTINS C.D., CHIANCA D.A., Jr. & FERNANDES L.G. (2011) Cardiac autonomic balance in rats submitted to protein restriction after weaning. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* **38**, 89-93.
- MATZKIN V.B., GEISLER C., CONIGLIO R., SELLES J. & BELLO M. (2006) Cholesterol concentrations in patients with Anorexia Nervosa and in healthy controls. *Int.J.Psychiatr.Nurs.Res.* **11**, 1283-1293.
- MAURER M., BADER M., BAS M., BOSSI F., CICARDI M., CUGNO M., HOWARTH P., KAPLAN A., KOJDA G., LEEB-LUNDBERG F., LOTVALL J. & MAGERL M. (2011) New topics in bradykinin research. *Allergy* **66**, 1397-1406.
- MCCAFFREY T.A. & CZAJA J.A. (1989) Diverse effects of estradiol-17 beta: concurrent suppression of appetite, blood pressure and vascular reactivity in conscious, unrestrained animals. *Physiol Behav.* **45**, 649-657.
- MCCARTY R., HORWATT K. & KONARSKA M. (1988) Chronic stress and sympathetic-adrenal medullary responsiveness. *Soc.Sci.Med.* **26**, 333-341.

- MCKNIGHT K.A., RUPP H., DHALLA K.S., BEAMISH R.E. & DHALLA N.S. (1999) Biphasic changes in heart performance with food restriction in rats. *J.Appl.Physiol* **87**, 1909-1913.
- MENDELSON F.A. & WARREN M.P. (2010) Anorexia, bulimia, and the female athlete triad: evaluation and management. *Endocrinol.Metab Clin.North Am.* **39**, 155-67, x.
- MIZUNO O., TAMAI H., FUJITA M., KOBAYASHI N., KOMAKI G., MATSUBAYASHI S. & NAKAGAWA T. (1993) Vascular responses to angiotensin II in anorexia nervosa. *Biol.Psychiatry* **34**, 401-406.
- NGUYEN DINH C.A. & TOUYZ R.M. (2011) A new look at the renin-angiotensin system--focusing on the vascular system. *Peptides* **32**, 2141-2150.
- NGUYEN G. (2011) Renin, (pro)renin and receptor: an update. *Clin.Sci.(Lond)* **120**, 169-178.
- OSKIS A., LOVEDAY C., HUCKLEBRIDGE F., THORN L. & CLOW A. (2012) Diurnal patterns of salivary cortisol and DHEA in adolescent anorexia nervosa. *Stress.* **15**, 601-607.
- PALMER R.M., ASHTON D.S. & MONCADA S. (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* **333**, 664-666.
- PANKEVICH D.E., TEEGARDEN S.L., HEDIN A.D., JENSEN C.L. & BALE T.L. (2010) Caloric restriction experience reprograms stress and orexigenic pathways and promotes binge eating. *J.Neurosci.* **30**, 16399-16407.
- PAULA R.D., LIMA C.V., KHOSLA M.C. & SANTOS R.A. (1995) Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats. *Hypertension* **26**, 1154-1159.
- PENITENTE A.R., FERNANDES L.G., CARDOSO L.M., SILVA M.E., PEDROSA M.L., SILVA A.L., HAIBARA A.S., MORAES M.F. & CHIANCA D.A. (2007) Malnutrition enhances cardiovascular responses to chemoreflex activation in awake rats. *Life Sci.* **81**, 609-614.
- PETREL C. & CLAUSER E. (2009) Angiotensin II AT1 receptor constitutive activation: from molecular mechanisms to pathophysiology. *Mol.Cell Endocrinol.* **302**, 176-184.
- PINOTTI M.F., LEOPOLDO A.S., SILVA M.D., SUGIZAKI M.M., DO NASCIMENTO A.F., LIMA-LEOPOLDO A.P., ARAGON F.F., PADOVANI C.R. & CICOGLA A.C. (2010) A comparative study of myocardial function and morphology during fasting/refeeding and food restriction in rats. *Cardiovasc.Pathol.* **19**, e175-e182
- RALEVIC V., MILLA P.J. & BURNSTOCK G. (1995) Effects of chronic vitamin E deficiency on vascular function--a study of sympathetic nerves, smooth muscle and endothelium of the mesenteric arterial bed of the rat. *Br.J.Pharmacol.* **116**, 2983-2988.
- REAUX A., FOURNIE-ZALUSKI M.C., DAVID C., ZINI S., ROQUES B.P., CORVOL P. & LLORENS-CORTES C. (1999) Aminopeptidase A inhibitors as potential central antihypertensive agents. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 13415-13420.
- REID I.A. (1992) Interactions between ANG II, sympathetic nervous system, and baroreceptor reflexes in regulation of blood pressure. *Am.J.Physiol* **262**, E763-E778

- RODRIGUES P.N., BANDEIRA M.M., ASSUMPCAO C.R., CARDOSO C.B., MANN G.E., BRUNINI T.M. & MENDES-RIBEIRO A.C. (2010) Oxidative stress, l-arginine-nitric oxide and arginase pathways in platelets from adolescents with anorexia nervosa. *Blood Cells Mol.Dis.* **44**, 164-168.
- ROSSOUW J.E., LABADARIOS D., DAVIS M. & WILLIAMS R. (1978) Vitamin B6 and aspartate aminotransferase activity in chronic liver disease. *S.Afr.Med.J.* **53**, 436-438.
- ROZENFELD R., REAUX A., ITURRIOZ X., FASSOT C., FOURNIE-ZALUSKI M.C., DAVID C., MAIGRET B., ROQUES B.P., CORVOL P. & LLORENS-CORTES C. (2003) Aminopeptidase A, generating one of the main effector peptides of the brain renin-angiotensin system, angiotensin III, plays a key role in central control of blood pressure. *Proc.West Pharmacol.Soc.* **46**, 39-44.
- SANTOS R.A., BROSNIHAN K.B., CHAPPELL M.C., PESQUERO J., CHERNICKY C.L., GREENE L.J. & FERRARIO C.M. (1988) Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension* **11**, I153-I157
- SANTOS R.A., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J. & ANDRADE S.P. (2000) Angiotensin-(1-7): an update. *Regul.Pept.* **91**, 45-62.
- SANTOS R.A., CASTRO C.H., GAVA E., PINHEIRO S.V., ALMEIDA A.P., PAULA R.D., CRUZ J.S., RAMOS A.S., ROSA K.T., IRIGOYEN M.C., BADER M., ALENINA N., KITTEN G.T. & FERREIRA A.J. (2006) Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. *Hypertension* **47**, 996-1002.
- SANTOS R.A., SIMOES E SILVA AC, MARIC C., SILVA D.M., MACHADO R.P., DE B., I, HERINGER-WALTHER S., PINHEIRO S.V., LOPES M.T., BADER M., MENDES E.P., LEMOS V.S., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., SCHULTHEISS H.P., SPETH R. & WALTHER T. (2003) Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 8258-8263.
- SAPRU H.N. (1996) Carotid chemoreflex. Neural pathways and transmitters. *Adv.Exp.Med.Biol.* **410**, 357-364.
- SCHMAIER A.H. (2002) The plasma kallikrein-kinin system counterbalances the renin-angiotensin system. *J.Clin.Invest* **109**, 1007-1009.
- SHAH A.M. & MACCARTHY P.A. (2000) Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. *Pharmacol.Ther.* **86**, 49-86.
- SIEGFRIED Z., BERRY E.M., HAO S. & AVRAHAM Y. (2003) Animal models in the investigation of anorexia. *Physiol Behav.* **79**, 39-45.
- SMINK F.R., VAN H.D. & HOEK H.W. (2012) Epidemiology of eating disorders: incidence, prevalence and mortality rates. *Curr.Psychiatry Rep.* **14**, 406-414.
- SOMERS V.K., MARK A.L., ZAVALA D.C. & ABBOUD F.M. (1989) Contrasting effects of hypoxia and hypercapnia on ventilation and sympathetic activity in humans. *J.Appl.Physiol* **67**, 2101-2106.
- STEINBERG S.F. (1999) The molecular basis for distinct beta-adrenergic receptor subtype actions in cardiomyocytes. *Circ.Res.* **85**, 1101-1111.

- SUCHARITA S., THOMAS T., ANTONY B. & VAZ M. (2012) Vitamin B12 supplementation improves heart rate variability in healthy elderly Indian subjects. *Auton.Neurosci.* **168**, 66-71.
- THOREN P. (1979) Role of cardiac vagal C-fibers in cardiovascular control. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* **86**, 1-94.
- TOMIYAMA A.J., MANN T., VINAS D., HUNGER J.M., DEJAGER J. & TAYLOR S.E. (2010) Low calorie dieting increases cortisol. *Psychosom.Med.* **72**, 357-364.
- TROPIA F.C., CARDOSO L.M., PEDROSA M.L., SILVA M.E., HAIBARA A.S., MORAES M.F. & CHIANCA D.A., Jr. (2001) Effects of low-protein diet on the baroreflex and Bezold-Jarisch reflex in conscious rats. *Nutr.Neurosci.* **4**, 99-107.
- TURILLAZZI E., BELLO S., NERI M., POMARA C., RIEZZO I. & FINESCHI V. (2012) Congestive heart failure as cause of death in an anorexia nervosa fatal case. *Int.J.Cardiol.*
- UNGER T., PAULIS L. & SICA D.A. (2011) Therapeutic perspectives in hypertension: novel means for renin-angiotensin-aldosterone system modulation and emerging device-based approaches. *Eur.Heart J.* **32**, 2739-2747.
- USTINOVA E.E. & SCHULTZ H.D. (1994) Activation of cardiac vagal afferents in ischemia and reperfusion. Prostaglandins versus oxygen-derived free radicals. *Circ.Res.* **74**, 904-911.
- VANHOUTTE P.M., BOULANGER C.M. & MOMBOULI J.V. (1995) Endothelium-derived relaxing factors and converting enzyme inhibition. *Am.J.Cardiol.* **76**, 3E-12E.
- VASQUEZ E.C., MEYRELLES S.S., MAUAD H. & CABRAL A.M. (1997) Neural reflex regulation of arterial pressure in pathophysiological conditions: interplay among the baroreflex, the cardiopulmonary reflexes and the chemoreflex. *Braz.J.Med.Biol.Res.* **30**, 521-532.
- VAZQUEZ M., OLIVARES J.L., FLETA J., LACAMBRA I. & GONZALEZ M. (2003) [Cardiac disorders in young women with anorexia nervosa]. *Rev.Esp.Cardiol.* **56**, 669-673.
- VERBERNE A.J. & GUYENET P.G. (1992) Medullary pathway of the Bezold-Jarisch reflex in the rat. *Am.J.Physiol* **263**, R1195-R1202
- WINSTON A.P. (2012) The clinical biochemistry of anorexia nervosa. *Ann.Clin.Biochem.* **49**, 132-143.
- WOJTOWICZ T., LEBIDA K. & MOZRZYMAS J.W. (2008) 17beta-estradiol affects GABAergic transmission in developing hippocampus. *Brain Res.* **1241**, 7-17.
- YAP S.H., HAFKENSCHIED J.C. & VAN TONGEREN J.H. (1975) Important role of tryptophan on albumin synthesis in patients suffering from anorexia nervosa and hypoalbuminemia. *Am.J.Clin.Nutr.* **28**, 1356-1363.
- ZHANG Y., LI N. & YANG Z. (2010) Perinatal food restriction impaired spatial learning and memory behavior and decreased the density of nitric oxide synthase neurons in the hippocampus of adult male rat offspring. *Toxicol.Lett.* **193**, 167-172.
- ZHUO J.L. & LI X.C. (2011a) New insights and perspectives on intrarenal renin-angiotensin system: focus on intracrine/intracellular angiotensin II. *Peptides* **32**, 1551-1565.

ZHUO J.L. & LI X.C. (2011b) New insights and perspectives on intrarenal renin-angiotensin system: focus on intracrine/intracellular angiotensin II. *Peptides* **32**, 1551-1565.