

**Universidade Federal de São Carlos
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação ampla UFSCar/UNESP**

JÉSSICA MATHEUS DE SÁ

**ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E HIDRO-
ELETROLÍTICAS INDUZIDAS POR DIETA HIPERLIPÍDICA**

Araraquara 2019

**Universidade Federal de São Carlos
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação ampla UFSCar/UNESP**

JÉSSICA MATHEUS DE SÁ

**ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E HIDRO-
ELETROLÍTICAS INDUZIDAS POR DIETA HIPERLIPÍDICA**

**Dissertação apresentada ao
Programa Interinstitucional
de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas
PIPGCF UFSCar/UNESP,
como parte dos requisitos
para obtenção do Título de
Mestre em Ciências
Fisiológicas.**

**Orientadora: Débora Simões
de Almeida Colombari**

Araraquara 2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e de Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros de comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Jéssica Matheus de Sá, realizada em 22/02/2019:



Profa. Dra. Debora Simões de Almeida Colombari
UNESP



Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro
UNICAMP



Profa. Dra. Patricia Maria de Paula
UNESP

**AO MEU PAI,
JESUS**

**À MINHA MÃE,
ABADIA**

**AOS MEUS IRMÃOS,
AMANDA E RAFAEL**

**AOS MEUS SOBRINHOS,
ANA BEATRIZ E LUIGI**

À Deus, por ser luz no meu caminho. Junto a Ele tudo foi mais fácil.

Aos meus pais, Jesus e Abadia, por não medirem esforços para a minha felicidade e realização. Aos meus irmãos Amanda e Rafael, pela proteção e parceria. Aos meus sobrinhos Ana Beatriz e Luigi por me mostrarem a cada dia o significado de amor.

À Prof. Dra. Débora Simões de Almeida Colombari, por todas as oportunidades e confiança concedidas a mim durante todos esses anos e principalmente pelo apoio em todos os momentos.

À minha amiga, Jessica Lumi pela amizade, apoio e carinho.

Aos meus amigos e colegas de laboratório e programa de pós-graduação em especial Celina, Emilson, Diulie, Lucas, Gabriel, Leandro, Gabriela e Isabela por tornarem os meus dias mais alegres.

Às pós-doutorandas Mariana Melo, Mariana Lauar, Marlusa Amarante e Silvia Gasparini pela amizade, ensinamentos e apoio.

À Rafaela Simioni pelo companheirismo e parceria em algumas análises.

Aos professores do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara e do programa interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pelos ensinamentos.

À Silas Pereira Barbosa pela dedicação e atenção em todos os momentos.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara Silvana A. D. Malavolta, Carla Molina, Mikail D. dos Santos e Ana V. de Oliveira por todo o suporte e auxílio

Aos sujeitos utilizados nesta pesquisa, sem os quais não seria possível sua realização, meu profundo respeito.

À agência de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – processo 2017/10762-6), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Código de Financiamento 001) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio Financeiro.

“Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e seus planos serão bem sucedidos”.

(Provérbios 3:5,6)

RESUMO

A obesidade tem sido apontada como uma epidemia mundial. Dados da literatura demonstram que a obesidade pode promover doenças cardiovasculares, como hipertensão, e a maior atividade do sistema renina-angiotensina (SRA) tem sido descrita como facilitadora da hipertensão induzida pela obesidade. Além disso, o SRA também está envolvido nos ajustes do balanço hidroeletrolítico, e, portanto, auxiliando na regulação da pressão arterial. Portanto, os objetivos do presente estudo foram: 1) verificar as alterações na pressão arterial e ingestão de água induzidas pela injeção central de ANG II em ratos alimentados com dieta hiperlipídica (DH); 2) verificar a participação dos receptores de angiotensina do subtipo AT1 no prosencéfalo nas alterações de pressão arterial observadas em ratos alimentados com DH; 3) verificar a ingestão diária de água e excreção urinária, bem como o consumo prandial de água em ratos alimentados com DH. Utilizamos ratos Holtzman (290-320 g) que foram alimentados com dieta padrão (DP, 5% de calorias provenientes de gordura) ou DH (45% de calorias provenientes de gordura) durante 6 semanas antes dos testes. Os experimentos foram realizados entre a 6ª e 7ª semana após o início da DH. Parte dos animais recebeu cânula de aço inoxidável no ventrículo lateral (VL) na 6ª semana após o início das dietas e os experimentos foram realizados na 7ª semana. Observamos que o efeito pressor, mas não a resposta dipsogênica à injeção de ANG II no VL, foi potencializado nos ratos DH. Os níveis mais elevados de pressão arterial basal encontrados em ratos DH foram revertidos por injeção no VL de losartan (antagonista do receptor AT1). Observamos também que a ingestão diária de água e o volume urinário foram significativamente reduzidos em ratos com DH, sem alterações significativas na excreção de sódio. Houve também uma redução no consumo prandial de água. Estes resultados mostram que os ratos DH têm uma resposta pressora potencializada à ANG II central sem alterar a resposta dipsogênica da ANG II e os receptores AT1 prosencefálicos parecem estar envolvidos com a hipertensão induzida pela obesidade. Finalmente, ratos DH apresentaram uma redução no consumo diário de água, por mecanismos ainda a esclarecer, e a redução no volume urinário parece estar relacionado a isso.

Palavras-chave: obesidade, pressão arterial, angiotensina II, ingestão de água, excreção renal.

ABSTRACT

Obesity has been pointed out as a worldwide epidemic. Data from the literature show that obesity can promote cardiovascular diseases such as hypertension, and the increased activity of the renin-angiotensin system (RAS) has been described as facilitating obesity-induced hypertension. In addition, RAS is also involved in hydroelectrolyte balance adjustments, and thus helping to regulate blood pressure. Therefore, the aims of the present study were, 1) to verify the changes in blood pressure and water intake induced by central ANG II in rats fed with a high-fat diet (HFD) diet; 2) to verify the participation of the AT1 receptors in the forebrain in the alterations of arterial pressure observed in rats fed with HFD; 3) to verify the daily water intake and urinary excretion, as well as the prandial consumption of water in rats fed with HFD. We used male Holtzman rats (290-320 g) that were fed a standard diet (DP, 5% calories from fat) or DH (45% calories from fat) for 6 weeks prior to testing. The experiments were performed between the 6th and 7th week after the onset of HFD. Part of the animals received a stainless steel cannula in the lateral ventricle (LV) at the 6th week after the beginning of the diets and the experiments were performed at week 7. We observed that the pressor effect, but not the dipsogenic response to the icv injection of ANG II, was potentiated in the HFD rats. The highest levels of basal blood pressure found in HFD rats were reversed by injection into the LV of losartan (angiotensin receptor antagonist of the subtype AT1). We also observed that daily water intake and urinary volume were significantly reduced in rats with DH, with no significant changes in sodium excretion. There was also a reduction in prandial water consumption. These results show that HFD rats have a potentiated pressor response to central ANG II without altering the dipsogenic response of ANG II and AT1 prosencephalic receptors appear to be involved in obesity-induced hypertension. Finally, HFD rats showed a reduction in daily water consumption, due to mechanisms still to be clarified, and the reduction in urinary volume seems to be related to this.

Keywords: obesity, arterial pressure, angiotensin II, water intake, renal excretion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho experimental do protocolo sobre alterações na ingestão de água e PAM induzidas por ANG II (25 ng/1 µl) no VL de animais alimentados com DP ou DH por 6 semanas.

Figura 2: Desenho experimental do protocolo sobre alterações na PAM e FC induzidas por losartan (100 µg/1 µl) no VL de animais alimentados com DP ou DH por 6 semanas.

Figura 3: Desenho experimental do protocolo sobre ingestão média de água e ração em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas.

Figura 4: Desenho experimental do protocolo sobre ingestão média de água e ração em ratos alimentados com dieta padrão (DP), dieta hiperlipídica (DH) ou DH *pellet* seco por 6 semanas.

Figura 5: Desenho experimental do protocolo sobre ingestão diária de água em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 3 semanas (DP / DH) e substituída para DP (DH / DP) na 3ª semana.

Figura 6: Desenho experimental do protocolo sobre consumo alimentar cumulativo, ingestão de água e relação água/alimento em ratos privados de alimento por 24 horas que receberam DP ou DH no primeiro experimento. (experimento de contrabalanço).

Figura 7: Desenho experimental do protocolo da medida ingestão de água e urina por 24 h antes e durante a alimentação com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas.

Figura 8: Alterações na ingestão de água induzidas por ANG II (25 ng/1 µl) injetada no VL de ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta

hiperlipídica (DH) por 6 semanas. Os dados são expressos como média \pm EPM; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. DP = 5 e DH = 8.

Figura 9: Alterações na pressão arterial média (PAM) induzidas por ANG II (25 ng/1 μ l) no VL de ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas. Os dados são expressos como média \pm EPM; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls; * $p < 0,05$ vs. DP; DP = 5 e DH = 8.

Figura 10: Efeito da microinjeção no VL de losartan (100 μ g/1 μ l), antagonista de receptores AT1, na pressão arterial média (PAM) de ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas. Os dados são expressos como média \pm EPM; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls; * $p < 0,05$ vs. DP; # $p < 0,05$ vs. DH PRE LOS; DP = 5 e DH = 6.

Figura 11: Efeito da microinjeção no VL de losartan (100 μ g/1 μ l), antagonista de receptores AT1, na frequência cardíaca (FC) de ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas. Os dados são expressos como média \pm EPM; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls; * $p < 0,05$ vs. DP; DP = 5 e DH = 6.

Figura 12: Fotomicrografia de uma seção transversal do encéfalo de um rato representativo dos grupos mostrando o local da microinjeção no VL (seta); ac = comissura anterior.

Figura 13: Expressão do RNAm no hipotálamo do (A) receptor AT1, (B) receptor AT2, (C) enzima conversora de angiotensina (ECA), e (D) enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas. Os dados são expressos como média \pm EPM, teste *t* de Student; DP = 6 e DH = 6.

Figura 14: Média semanal da ingestão diária de água em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas. A seta indica que no tempo 0 os animais estavam todos com DP. Os dados são expressos como média \pm EPM; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls; * $p < 0,05$ vs. DP; DP = 5 e DH = 5.

Figura 15: Média semanal da ingestão diária de alimento em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas. A seta indica que no tempo 0 os animais estavam todos com DP. Os dados são expressos como média \pm EPM; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls; * $p < 0,05$ vs. DP. DP = 5 e DH = 5.

Figura 16: Média semanal de ingestão de calorias em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas. A seta indica que no tempo 0 os animais estavam todos com DP. Os dados são expressos como média \pm EPM; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls; * $p < 0,05$ vs. DP. DP = 5 e DH = 5.

Figura 17: Ingestão diária de água em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 3 semanas (DP/DH) e substituída para DP (DH/DP) na 3ª semana para os ratos DH. A seta indica que no tempo 0 os animais estavam todos com DP. Os dados são expressos como média \pm EPM; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls; * $p < 0,05$ vs. SD. DP = 5 e DH = 5.

Figura 18: Média semanal da ingestão diária de água em ratos alimentados com dieta padrão (DP), dieta hiperlipídica (DH) ou DH *pellet* seco por 6 semanas. Os dados são expressos como média \pm EPM; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls; * $P < 0,05$ vs. DP; DP = 5; DH = 10 e DH *pellet* seco = 5.

Figura 19: Ingestão cumulativa e concomitante de (A) dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) e (B) água em ratos submetidos a 24 h de privação de alimento. Em (C) está representado a relação água/alimento. Os dados são

expressos como média \pm EPM; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls; * $p < 0,05$ vs. DP; DP = 5 e DH = 5.

Figura 20: Ingestão cumulativa e concomitante de (A) dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) e (B) água em ratos submetidos a 24 h de privação de alimento. Teste de contrabalanceamento. Em (C) está representado a relação água/alimento. Os dados são expressos como média \pm EPM; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls; * $p < 0,05$ vs. DP; DP = 5 e DH = 5.

Figura 21: Valores de (A) volume urinário, (B) ingestão de água, (C) excreção de sódio, (D) excreção de potássio medidos por 24 h uma vez por semana durante 6 semanas em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH). Os dados são expressos como média \pm EPM; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls; * $p < 0,05$ vs. DP; DP = 5 e DH = 5.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros metabólicos em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas.

LISTA DE ABREVIATURAS

aa - Aminoácido
ANG I – Angiotensina I
ANG II – Angiotensina II
AT1 – receptor de angiotensina do subtipo 1
AT2 – receptor de angiotensina do subtipo 2
bpm – batimentos por minuto
DH – Dieta hiperlipídica
DP – Dieta padrão
ECA – Enzima conversora de angiotensina
FC – Frequência cardíaca
icv – intracerebroventricular
IMC- Índice de massa corporal
IL-1 β – Interleucina 1 β
IL-6 – Interleucina 6
IL-10 – Interleucina 10
LPS- Lipoplissacarídeo
LOS - Losartan
MES – Mesentérico
NTS – Núcleo do trato solitário
OSF – Órgão subfornical
OVLT – Órgão vasculoso da lâmina terminal
PAM – Pressão arterial média
PAP – Pressão arterial pulsátil
PAS – Pressão arterial sistólica
Pc – Peso corporal
PVN – Núcleo paraventricular do hipotálamo
RET – Retroperitoneal
RNAm – RNA mensageiro
RVL – Área rostroventrolateral do bulbo
SNC- Sistema nervoso central
SON- Núcleo supraóptico

SRA – Sistema renina-angiotensina
TNF- α – Fator de necrose tumoral- α
TTI – Teste de tolerância à insulina
VL- Ventrículo lateral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Obesidade e epidemiologia.....	19
1.2 Obesidade e hipertensão.....	20
1.3 Obesidade e equilíbrio hidroeletrolítico.....	23
2. OBJETIVOS.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Animais.....	26
3.2 Dietas.....	26
3.3 Anestesia e Eutanásia.....	26
3.4 Pressão arterial e gravação da freqüência cardíaca.....	27
3.5 Cânulas de ventrículo lateral (VL).....	27
3.6 Injeção de drogas no ventrículo lateral.....	27
3.7 Medida do consumo de água e excreção urinária.....	28
3.8 Quantificação da expressão gênica de componentes do SRA no hipotálamo.....	28
3.9 Coleta de sangue e tecido.....	29
3.10 Teste de tolerância à insulina (TTI).....	30
3.11 Histologia.....	30
3.12 Análise Estatística.....	31
4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	32
4.1 Resposta pressórica e ingestão de água induzida pela angiotensina II central em ratos alimentados com DH.....	32
4.2 Efeitos da DH por 6 semanas sobre a expressão do RNAm de componentes do SRA no hipotálamo.....	34
4.3 Efeitos da DH por 6 semanas na sensibilidade à insulina.....	34
4.4 Efeitos da DH no consumo diário de água e alimento.....	34
4.5 Ingestão de água associada à ingestão alimentar em ratos alimentados com DH.....	36
4.6 Efeito da DH na excreção urinária.....	38
5. RESULTADOS.....	39

5.1	Peso corporal e perfil metabólico em ratos alimentados com DH...	39
5.2	Mecanismos angiotensinérgicos no prosencéfalo envolvidos com a pressão arterial e ingestão de água em ratos alimentados com DH	41
5.3	Efeito da DH por 6 semanas sobre a expressão gênica no hipotálamo.....	46
5.4	Consumo diário de água e alimentos em ratos alimentados com DH	48
5.5	Refeição associada ao consumo de água em ratos alimentados com DH.....	54
5.6	Excreção renal em ratos alimentados com DH.....	57
6.	DISCUSSÃO.....	58
7.	CONCLUSÃO.....	64
8.	REFERÊNCIAS.....	65

1. Introdução

1.1 Obesidade e epidemiologia

A obesidade é definida como o acúmulo excessivo de gordura que traz prejuízos à saúde do indivíduo (Who, 2016). Segundo a Organização Mundial da Saúde, a maioria da população vive em países em que o sobrepeso e obesidade levam a um maior índice de morte se comparado com o índice de morte por baixo peso (WHO, 2016). Apontada como uma epidemia mundial (Mokdad *et al.*, 2003), a obesidade vem se tornando um dos maiores problemas de saúde pública. Nas últimas décadas, alguns fatores têm sido atribuídos ao ganho de peso, como o aumento da ingestão de alimentos altamente energéticos com alto teor de gordura e aumento da inatividade física (Finucane *et al.*, 2011; Krogh-Madsen *et al.*, 2014; (Ncd-Risc)*, 2016).

Dados da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico-Vigitel (Vigitel, 2017), criado pelo Ministério da Saúde, para que se minimizem doenças crônicas não transmissíveis nos estados brasileiros, demonstraram pelo índice de massa corporal (IMC) que no ano de 2017 apesar do brasileiro já ter começado a introduzir hábitos saudáveis, com uma ingestão regular de frutas e hortaliças, mais da metade da população brasileira está com excesso de peso variando a frequência entre 48,1% de adultos com excesso de peso em Palmas e 61,3% em Manaus (Vigitel, 2017).

A epidemia da obesidade além de promover prejuízos à saúde do indivíduo está associada também com o aumento de gastos pelos sistemas públicos de saúde como o SUS, onde a população brasileira está fortemente apoiada para obter assistência médica. Além disso, o aumento dos custos indiretos ou sociais também é destacado, uma vez que o excesso de peso pode levar a diminuição da qualidade de vida e até mesmo perda da produtividade (Bahia e Araújo, 2014).

O aumento do sobrepeso e obesidade como consequência, pode levar a doenças como diabetes tipo 2, e doenças cardiovasculares tais como hipertensão (Mancia *et al.*, 2007; Schlaich *et al.*, 2009; Finucane *et al.*, 2011).

1.2 Obesidade e hipertensão

Dentre as doenças cardiovasculares, a hipertensão é altamente prevalente em obesos [revisão em (Schlaich *et al.*, 2009; Aghamohammadzadeh e Heagerty, 2012; Hall *et al.*, 2015)]. A correlação positiva entre obesidade e hipertensão é forte, consistente, e confirmada por estudos genéticos e clínicos (Dorresteijn *et al.*, 2012). Estima-se que a cada aumento de 10% no IMC (calculado pela divisão da massa corporal pela altura ao quadrado), está associado à elevação da pressão arterial sistólica em 3,9 mmHg (Timpson *et al.*, 2009). Vários fatores têm sido correlacionados com o surgimento da hipertensão originada através da obesidade. Estes incluem a inflamação periférica e no sistema nervoso central (SNC), aumento da atividade do sistema nervoso simpático, aumento dos níveis plasmáticos de leptina e insulina, alterações no barorreflexo e ativação do sistema renina-angiotensina (SRA) central e periférico (Boustany *et al.*, 2005; De Souza *et al.*, 2005; Arnold *et al.*, 2009; Hall *et al.*, 2010; Fardin *et al.*, 2012; Guillemot-Legris *et al.*, 2016; Speretta *et al.*, 2016; Xue *et al.*, 2016; Speretta *et al.*, 2018). Além disso, evidências recentes apontaram para uma interação entre esses mecanismos (Hilzendeger *et al.*, 2012; Sriramula *et al.*, 2013; De Kloet *et al.*, 2014; Xue *et al.*, 2016), desta forma, torna-se importante, o estudo das alterações cardiovasculares derivadas da obesidade e possíveis mecanismos e vias centrais envolvidas.

Dentre os possíveis mecanismos que podem estar com sua atividade desregulada durante a obesidade, podemos destacar o SRA. Esse sistema é composto por uma cascata em que através da produção de renina pelo rim, esta age sobre uma proteína plasmática o angiotensinogênio, liberando um peptídeo de 10 aminoácidos (aa), a angiotensina I (ANG I). Após alguns segundos de sua formação, dois aa são removidos para a formação de um peptídeo de 8 aa, a angiotensina II (ANG II). Essa conversão ocorre no pulmão, e é catalisada pela enzima conversora de angiotensina, a ECA, que está presente na membrana do endotélio pulmonar.

A participação do SRA é essencial na regulação cardiovascular e do equilíbrio hidroeletrolítico (Mckinley *et al.*, 1996; Kaschina e Unger, 2003). A ANG II pode atuar em dois subtipos de receptores, AT1 e AT2 (De Gasparo *et al.*, 2000). Os efeitos clássicos da ANG II, tais como vasoconstrição, secreção

de aldosterona, reabsorção de sódio e água e facilitação simpática são mediados pelos receptores AT1 periféricos (Kaschina e Unger, 2003), enquanto que a sede e apetite ao sódio, secreção de vasopressina e aumento da atividade simpática são mediadas pelos receptores AT1 no SNC (Mckinley *et al.*, 1996; Kaschina e Unger, 2003). Por outro lado, está bem descrito que os efeitos protetores da ANG II se dão por meio da ativação de receptores do subtipo AT2, seja na periferia ou no SNC (Blanch *et al.*, 2014; Sumners *et al.*, 2015; Ruchaya *et al.*, 2016; Speretta *et al.*, 2019).

Durante a obesidade, tem sido demonstrado que um aumento na atividade do SRA periférico, resulta em níveis elevados de ANG II (Boustany *et al.*, 2004). Ainda, o bloqueio de receptores AT1 periféricos promoveu uma redução dos níveis elevados de pressão arterial em ratos obesos (Boustany *et al.*, 2005). Esses dados demonstram uma forte ligação entre a obesidade, o aumento da pressão arterial e o SRA. Além disso, demonstrou-se um aumento na expressão dos componentes hipertensivos do SRA como dos receptores AT1 e ECA em diferentes áreas do encéfalo envolvidas com a regulação cardiovascular e do equilíbrio hidro-eletrolítico, tais como no órgão subfornicial (OSF), presente na lâmina terminal no prosencéfalo e no núcleo do trato solitário (NTS), no bulbo (Erdos *et al.*, 2011; De Kloet *et al.*, 2014; Speretta *et al.*, 2016; Xue *et al.*, 2016; Speretta *et al.*, 2019).

Uma questão que se discute é como ocorre o aumento da atividade do SRA em ratos obesos, e a chave pode estar localizada no tecido adiposo. Dados da literatura evidenciaram a existência de todos os RNAm e a expressão de algumas proteínas dos componentes do SRA em adipócitos do tecido branco (Karlsson *et al.*, 1998; Marcus *et al.*, 2013). Especificamente, foi encontrado no tecido adiposo o gene de expressão de renina, que ainda expressa enzimas, catepsina D e G, que podem, respectivamente, produzir ANG I em ANG II através de rotas alternativas do SRA (Karlsson *et al.*, 1998). Além disso, em animais alimentados com dieta hiperlipídica houve um aumento da expressão de receptores de renina no tecido adiposo, que podem levar a um aumento da atividade do SRA local e superprodução de ANG II, a qual pode extravasar do tecido adiposo branco para a circulação e aumentar os níveis sistêmicos de ANG II [revisão em (Marcus *et al.*, 2013)]. Outros estudos utilizando camundongos transgênicos que não expressavam angiotensinogênio no tecido

adiposo, ou seja, *knockout* para angiotensinogênio, tiveram diminuição da pressão arterial comparados com os animais controle (Yiannikouris, Karounos, *et al.*, 2012). Esses autores também demonstraram que a hipertensão induzida pela obesidade foi prevenida em camundongos deficientes de angiotensinogênio no tecido adiposo (Yiannikouris, Gupte, *et al.*, 2012), mas não preveniu o desenvolvimento da obesidade. Em conjunto esses dados demonstram a contribuição do SRA local para o SRA circulante e estabelecendo uma correlação entre a massa adiposa corpórea, o SRA e a pressão arterial.

Dados do nosso laboratório demonstraram que ratos alimentados com dieta hiperlipídica (DH) durante 6 semanas tiveram aumento da expressão gênica de componentes do SRA, como o receptor AT1 e a ECA no núcleo do trato solitário (NTS) (Speretta *et al.*, 2016; Speretta *et al.*, 2019), região situada na região dorsal do bulbo e importante para a regulação cardiovascular [revisão em (Zoccal *et al.*, 2014)]. Verificou-se que havia um aumento da expressão gênica do receptor AT1 e da ECA e redução dos componentes hipotensores/protetores do SRA, tais como receptor AT2 e receptor Mas (Speretta *et al.*, 2016; Speretta *et al.*, 2019), este último, sítio de ação do peptídeo angiotensina 1-7, produto da clivagem de ANG II pela enzima conversora do tipo 2 (ECA 2) [revisão em (Villela *et al.*, 2015)]. No prosencéfalo, também foi demonstrado que a DH aumenta a expressão gênica de componentes do SRA como o receptor AT1 e a ECA (De Kloet *et al.*, 2014; Xue *et al.*, 2016).

Já está bem estabelecido que ratos alimentados com dieta hiperlipídica têm aumento da pressão arterial e redução da sensibilidade do barorreflexo (Hall *et al.*, 2010; Fardin *et al.*, 2012; Speretta *et al.*, 2016; Speretta *et al.*, 2018; Speretta *et al.*, 2019). Dados recentes do nosso laboratório demonstraram que o bloqueio de receptores AT1 no NTS de ratos alimentados com DH por 6 semanas, reduziu a pressão arterial aumentada nesses animais e promoveu uma melhora do barorreflexo (Speretta *et al.*, 2019). Estudos de Xue e cols (Xue *et al.*, 2016), demonstraram que ratos alimentados 3 semanas com DH não apresentavam alteração na pressão arterial, porém, estes animais apresentaram aumento da pressão arterial induzida por dose sub-pressora de ANG II injetada periféricamente, demonstrando uma sensibilização nessa

situação e que este efeito possa ser decorrente de uma ativação de componentes hipertensores do SRA no SNC. *Porém, até o momento não foi determinado se apenas uma administração aguda de ANG II no prosencéfalo poderia produzir um efeito pressor maior nos ratos alimentados com DH, bem como se uma vez estabelecida a hipertensão pela obesidade, se o bloqueio de receptores AT1 no prosencéfalo a reverteria.*

1.3 Obesidade e equilíbrio hidroeletrólítico

Outro fator que pode estar relacionado ao aumento da pressão arterial ou até mesmo sua manutenção em ratos obesos são as mudanças no balanço hidro-eletrólítico. A exemplo, o aumento da reabsorção de sódio observado em alguns modelos de obesidade, pode ser causado por um aumento na atividade do SRA-aldosterona, do sistema nervoso simpático, por hiperinsulinemia ou mesmo por compressão renal causado pelo aumento do tecido adiposo na obesidade (Sugerman *et al.*, 1997; Bickel *et al.*, 2001; Hall, 2003; De Paula *et al.*, 2004; Hall *et al.*, 2015; Nizar *et al.*, 2016).

Sugerman e col. (Sugerman *et al.*, 1997), demonstraram que pacientes com obesidade mórbida tiveram um aumento da pressão intra-abdominal que foi associado ao aumento da reabsorção de sódio e conseqüentemente da pressão arterial devido a elevação da pressão pleural através de uma modificação na posição do diafragma levando a diminuição do retorno venoso e ativação do SRA. Da mesma forma, o rápido aumento de peso e gordura ao redor dos rins de cães obesos, levou a um aumento da reabsorção tubular de sódio, sendo este, um mecanismo importante pelo qual a obesidade pode levar à hipertensão (Henegar *et al.*, 2001; Hall, 2003), ou mesmo a maior secreção de aldosterona observada em cães obesos tem sido descrita como um mecanismo para o aumento da reabsorção de sódio, com conseqüente aumento da pressão arterial (De Paula *et al.*, 2004). Por outro lado, embora a excreção de sódio diária em ratos Zucker obesos seja semelhante aos ratos Zucker magros (Omouessi *et al.*, 2007), foi evidenciado em ratos Zucker obesos, uma excreção menor de sódio quando submetidos à uma sobrecarga sódica, comparado aos ratos Zucker magros decorrente de uma maior expressão de transportadores de sódio no néfron, possivelmente decorrente de uma hiperinsulinemia (Bickel *et al.*, 2001). Os ratos Zucker são uma linhagem

de ratos que tem mutação no gene do receptor da leptina, tornando-se quando adultos obesos, mesmo que alimentados com dieta padrão de rato (Kurtz *et al.*, 1989).

Desordens na ingestão de água também foram encontradas em indivíduos obesos. Na obesidade, estudos demonstraram que a relação entre a ingestão de água e a osmolaridade urinária, um biomarcador de hidratação, é modificada pelo aumento do peso em adultos dos EUA (Rosinger *et al.*, 2016). Apesar do consumo de água ser aumentado em indivíduos obesos, estes apresentam também um aumento da osmolaridade da urina, sugerindo-se assim, que adultos obesos são mais propensos a estar em um estado desidratado (Rosinger *et al.*, 2016). Por outra perspectiva, Thornton em 2016 (Thornton, 2016) sugeriu que fatores como a necessidade de urinar com frequência e o não conhecimento a respeito dos benefícios da ingestão de água resultam em uma população levemente desidratada, hipovolêmica. Esta desidratação poderia estar conduzindo a liberação contínua de ANG II que resulta em uma vasoconstrição do tecido adiposo e muscular, maturação de pré-adipócitos e disfunção mitocondrial fazendo com que haja uma diminuição do metabolismo e conseqüentemente diminuição da lipólise levando ao surgimento da obesidade (Thornton, 2016).

Há muito se observa que os ratos que comem alimentos secos bebem água enquanto comem, em um comportamento chamado sede prandial (Teitelbaum e Epstein, 1962). Em ratos Zucker obesos, medidas da ingestão de água por 24 h mostraram que mesmo alimentando-se com a mesma quantidade de alimento, a ingestão de água foi menor quando comparada a ratos Zucker magros (Omouessi *et al.*, 2007). Esses autores não relatam em que momento no desenvolvimento da obesidade do rato Zucker obeso começou a ocorrer a redução na ingestão de água.

Apesar dos estudos acima, mais estudos são necessários para se verificar a correlação do consumo de água além da excreção urinária em ratos alimentados com DH, bem como se há alteração na resposta dipsogênica da ANG II no procéncéfalo (Epstein et al., 1970; Urzedo-Rodrigues et al., 2011; Roncari et al., 2018) de ratos alimentados com DH.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

- 1) Verificar as alterações na pressão arterial e ingestão de água induzidas pela injeção central de ANG II em ratos alimentados com dieta hiperlipídica (DH);
- 2) Verificar a participação dos receptores AT1 no prosencéfalo nas alterações de pressão arterial observadas em ratos alimentados com DH;
- 3) Verificar a ingestão diária de água e excreção urinária, bem como o consumo prandial de água em ratos alimentados com DH.

3. Material e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Holtzman adultos (290 a 300 g) procedentes do Biotério do Campus de Araraquara da UNESP, mantidos em caixas plásticas coletivas (três animais por caixa) ou em gaiolas individuais de acordo com o protocolo (ver abaixo) com livre acesso a ração e água e em salas climatizadas (temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade de $50 \pm 10\%$), com ciclo claro-escuro de doze horas (luzes acesas das 7 h às 19:00 h). Os protocolos propostos estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e estão em análise na Comissão Ética e Uso de Animais da FOAr/UNESP (CEUA 22/2017).

3.2 Dietas

Duas dietas foram utilizadas na presente investigação, ração padrão (DP) e dieta hiperlipídica (DH). A DP foi composta por uma dieta balanceada da marca SOCIL (Neovia nutrição e saúde animal LTDA, Descalvado, SP) contendo: 23 g de proteína, 49 g de carboidrato, 4 g de gordura e 5 g de fibra (por 100 g de dieta), conforme fornecido pelo fabricante e 9,9% de umidade como na análise bromatológica. A DH foi composta por uma ração padrão concentrada de ração com mistura de minerais e vitaminas (PragSoluções Biociências, Jaú, SP, Brasil) adicionada de amendoim, chocolate ao leite e biscoito na proporção de 3: 2: 2: 1 como anteriormente descrito (Speretta *et al.*, 2016) Todos os componentes foram triturados, misturados e preparados na forma de *pellets* (pelotas). O conteúdo final da DH foi de 22,3 g de proteína, 40,8 g de carboidrato, 24,5 g de gordura total, 5,9 g de fibra por 100 g de ração e 22% de umidade. Os valores calóricos das dietas foram de aproximadamente 3,24 kcal/g para a DP e 4,73 kcal/g para a DH.

3.3 Anestesia e Eutanásia

Os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina [80 mg/kg de peso corporal (pc)] combinada com xilazina (7 mg/kg de pc União Química Farmacêutica Nacional, Embu-Guaçu, SP, Brazil) para todas as cirurgias. Após as cirurgias, os animais receberam uma dose profilática

intramuscular de antibiótico (benzilpenicilina - 80.000 UI/estreptomicina - 33 mg; Veterinária Pentabiotica - Porte Pequeno, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil) e injeção subcutânea de analgésico / anti (cetoprofeno 1% - 0,03 ml/rato; Ketoflex, Mundo Animal, São Paulo, SP, Brasil). No final dos experimentos os ratos foram eutanasiados com tiopental sódico (70 mg/kg pc, Cristália, Itapira, SP, Brasil) ou com isoflurano (4% em 100% O₂; Cristália, Itapira, SP, Brasil), dependendo do protocolo (vide abaixo).

3.4 Pressão arterial e gravação da frequência cardíaca

Os ratos foram anestesiados como descrito acima, e um cateter foi inserido na aorta abdominal através da artéria femoral para registro de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). Resumidamente, o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (P23 DB, Statham, Costa Mesa, Califórnia, EUA) acoplado a um amplificador de sinal (ETH-200 Bridge Bio Amplifier, Chicago, IL, EUA) e a um sistema de aquisição e análise de dados (PowerLab, ADInstruments, Castle Hill, NSW, Austrália). Foram registrados simultaneamente PAP, PAM e FC. A PAM foi calculada a partir do sinal de PAP. A FC foi calculada como a frequência instantânea do sinal de PAP. Os registros foram feitos em animais acordados com livre movimentação.

3.5 Implante de cânulas no ventrículo lateral (VL)

Os ratos foram anestesiados como acima descrito e colocados em um aparelho estereotáxico (Kopf, Tujunga, CA, EUA). O crânio foi nivelado entre bregma e lambda. Cânula de calibre 23 de aço inoxidável (10 × 0,6 mm) foi implantada em direção ao ventrículo lateral (VL) utilizando as seguintes coordenadas: 0,3 mm caudal a bregma, 1,8 lateral e 3,6 mm abaixo da superfície do crânio. A cânula foi fixada ao crânio por meio de resina acrílica dentária e parafusos joalheiros e os animais receberam dose profilática de penicilina antiinflamatória como descrito anteriormente.

3.6 Injeção de drogas no ventrículo lateral

ANG II (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e losartana (antagonista do receptor AT₁; Dupont; Wilmington, DE, EUA) foram dissolvidos em soro

fisiológico (NaCl 0,15 M), que também foi utilizado como veículo para injeções. ANGII foi utilizado na concentração de 25 ng/1 μ l (Roncari *et al.*, 2018). O losartan foi utilizado na dose de 100 μ g/1 μ l (De Luca *et al.*, 1996). As injeções foram preparadas utilizando uma seringa Hamilton (Hamilton, Reno, NV, EUA) de 10 μ l, ligada por tubo de polietileno PE-10 a uma agulha introduzida no cérebro através de cânula guia. A agulha para injeção no VE foi 2 mm mais longa que a cânula guia.

3.7 Medida do consumo de água e excreção urinária

A ingestão diária de água de cada animal foi registrada utilizando garrafas de polipropileno com capacidade de 100 ml com divisões de 1 ml. Para o teste de consumo de água, a água foi medida usando buretas de vidro com divisões de 0,1 ml equipadas com um bico de bebida de metal. Para a ingestão de alimentos, uma quantidade pré-pesada de pellets de ração (DP ou DH) foi dada aos animais, e no final, o alimento ingerido foi subtraído da quantidade pré-pesada. A quantidade total de calorias ingeridas foi determinada pela multiplicação das calorias totais da dieta pela quantidade total de alimentos ingeridos pelos ratos.

Para as medidas de excreção urinária, os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas e a urina foi coletada por gravidade em tubos graduados com divisões de 0,1 ml. As amostras de urina foram analisadas em um analisador de Na⁺ / K⁺ (NOVA 1, Nova Biomedical, Waltham, MA, USA). A excreção total de Na⁺ e K⁺ foi calculada pela concentração de Na⁺ e K⁺ multiplicada pelo volume urinário.

3.8 Quantificação da expressão gênica de componentes do SRA no hipotálamo

Após a decapitação sob anestesia com isoflurano, os encéfalos foram rapidamente retirados em ambiente livre de RNase e o hipotálamo foi removido por microdissecção. Para a coleta do hipotálamo foram consideradas como margens: anterior, lâmina terminal com a comissura anterior acima e o quiasma óptico abaixo; posterior, fossa interpeduncular; dorsal, sulco hipotalâmico; ventral, túber cinéreo. A parte rostral do hipotálamo inclui o órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT), núcleo pré-óptico mediano (MnPO) e órgão subfornical

(SFO), enquanto que as porções medial e caudal contém os núcleos paraventricular (PVN), supra-óptico (SON), núcleo ventromedial e dorsomedial do hipotálamo. O material colhido foi transferido para um tubo livre de RNase. Em seguida, os tecidos foram homogeneizados com auxílio de um micromotor com 300 µl de solução de lise para RNA conforme kit de extração (RNAqueus 4-PCR KIT, Life Technologies, Grand Island, EUA.) e foram armazenados no -80 C até o momento da conversão de RNA em cDNA. O RNAm isolado foi submetido a reação de transcriptase reversa para conversão em cDNA utilizando o kit de conversão (High capacity RNA to cDNA, Life Technologies, Grand Island, EUA) e as amostras foram testadas em duplicata utilizando um sistema de PCR em tempo real StepOne. As sequências de cDNA obtidas a partir da reação foram usadas para quantificação através de soluções apropriadas (Master Mix Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e sondas (*primers*) específicos. As reações com 45 ciclos foram realizadas em um aparelho ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As sequências de cDNA obtidas a partir da reação foram usadas para quantificação através de sondas comerciais para os genes do sistema renina-angiotensina (SRA), a saber: receptor AT₁ (Rn01435427_m1), receptor AT₂ (Rn005660677_s1), enzima conversora de angiotensina (ECA; Rn00561094_m1) e enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2, Rn01416293_s1), todos da Life Technologies, Grand Island, EUA. Padrões de expressão dos genes selecionados foram normalizados pelo gene GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Rn99999916_s1; Life Technologies, Grand Island, EUA) constitutivamente expresso e a expressão relativa foi quantificada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

3.9 Coleta de sangue e tecido

O sangue troncular foi coletado em tubos sem anti-coagulante para insulina e leptina. O sangue foi centrifugado (1.200 g por 10 min a 4 ° C). Os níveis séricos de insulina e leptina foram analisados usando kits ELISA disponíveis comercialmente, seguindo as instruções do fabricante (MILLIPORE, Billerica, MA, EUA para leptina e insulina) e Na⁺ and K⁺ foram analisados por Na⁺/K⁺ analyzer (NOVA 1, Nova Biomedical, Waltham, MA, USA). Amostras de sangue

foram coletadas da veia caudal e a glicemia foi medida por meio de tiras teste padronizadas (Accu-Chek Active / Roche Diagnóstica Brasil Ltda. São Paulo, SP). Os tecidos adiposos retroperitoneal (RET), epididimal (EPI) e mesentérico (MES), foram imediatamente retirados e pesados após a eutanásia dos animais. A coleta de tecido adiposo foi realizada de acordo com as descrições de Cint (Cinti, 2005).

3.10 Teste de tolerância à insulina (TTI)

A sensibilidade à insulina foi medida pelo teste de tolerância à insulina (TTI) e a constante de velocidade de desaparecimento de glicose no plasma (Kitt) foi calculada usando a fórmula de $0,693/\text{meia-vida biológica } (t_{1/2})$. O $t_{1/2}$ da glicemia foi calculada a partir da inclinação da análise dos quadrados mínimos da concentração de glicose no plasma durante a fase linear de declínio (Bonora *et al.*, 1989; Delbin *et al.*, 2012). Os ratos foram submetidos a um TTI após 8 horas de jejum. A insulina humana recombinante (Novolin R, Novo Nordisk, Montes Claros, MG, Brasil) foi administrada ip numa dose de 2,0 UI/kg e amostras de sangue foram coletadas em 0, 10, 15, 20, 30 e 60 min da veia da cauda e a glicemia foi medida usando tiras de teste padrão (Accu-Chek Active / Roche Diagnóstica Brasil Ltda. São Paulo, SP). O TTI é expresso como Kitt (%/min), ou seja, a porcentagem da redução da concentração de glicose no plasma por minuto (Delbin *et al.*, 2012).

3.11 Histologia

No final dos experimentos, injetou-se 1 μl de solução azul de Evans a 2% no VL dos animais que tinham o implante. Posteriormente, os animais foram profundamente anestesiados com tiopental sódico ou com isoflurano, dependendo do protocolo (vide seção de protocolos), e os encéfalos foram removidos e colocados em uma solução de formalina 10% por 7 dias. Após esse período, os encéfalos foram congelados, cortados coronalmente em cortes de 50 μm em micrótomo de congelamento (Leica, CM1850, Wetzlar, Hesse, Alemanha), corados com Giemsa e analisados por microscopia de luz

(Leica DM5500 B, Wetzlar, Hesse, Alemanha) para verificar a localização das injeções no VL.

3.12 Análise Estatística

Todos os dados são expressos como média \pm SEM. Análise de variância de de duas vias seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls ou teste t de Student foram usados para comparações, conforme indicado. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Todos os animais tiveram seus pesos corporais registrados semanalmente e o tecido adiposo coletado no final dos experimentos, exceto quando indicado.

4.1 Resposta pressórica e ingestão de água induzida pela angiotensina II central em ratos alimentados com DH

Em um grupo de ratos, após 6 semanas sendo alimentados com DP ou DH, uma cânula de aço inoxidável foi implantada no VL e após 5-7 dias de recuperação os animais receberam uma injeção de salina (NaCl 0,15 M, 1 μ l) ou ANG II (25 ng/1 μ l) e a ingestão de água foi analisada por 60 min e registrada a cada 15 min. Após 2 dias, um cateter foi implantado na artéria femoral e no dia seguinte, em ratos acordados, a PAM foi registrada por um período controle (20 min), seguida de microinjeção de solução salina (1 μ l) e 10 min após ocorreu a microinjeção de ANG II (25 ng/1 μ l). As variáveis cardiovasculares foram registradas por um período de 25 minutos após a administração da ANG II. Após 24 horas da finalização dos experimentos, os animais foram eutanasiados e tiveram sangue coletado para análise da concentração sérica de leptina, insulina, Na⁺ e K⁺ (Figura 1).

Continuando a investigação do papel da ANG II na regulação cardiovascular em ratos com DH, outro grupo de ratos, após ter sido alimentado por 6 semanas com DP ou DH, recebeu uma cânula de aço inoxidável no VL, seguida de 5-7 dias depois por canulação da artéria femoral com implantação de um cateter para registro do PAM e da FC. No dia seguinte, com os ratos conscientes, a PAM e FC foram registrados por um período de controle (20 min), seguido por microinjeção salina em VL (0,15 M NaCl, 1 mL), e após 10 min, microinjecção de losartan (AT1 antagonista do receptor, 100 μ g/1 μ l). As variáveis cardiovasculares foram registradas por um período de 40 minutos após a administração de losartan (Figura 2).

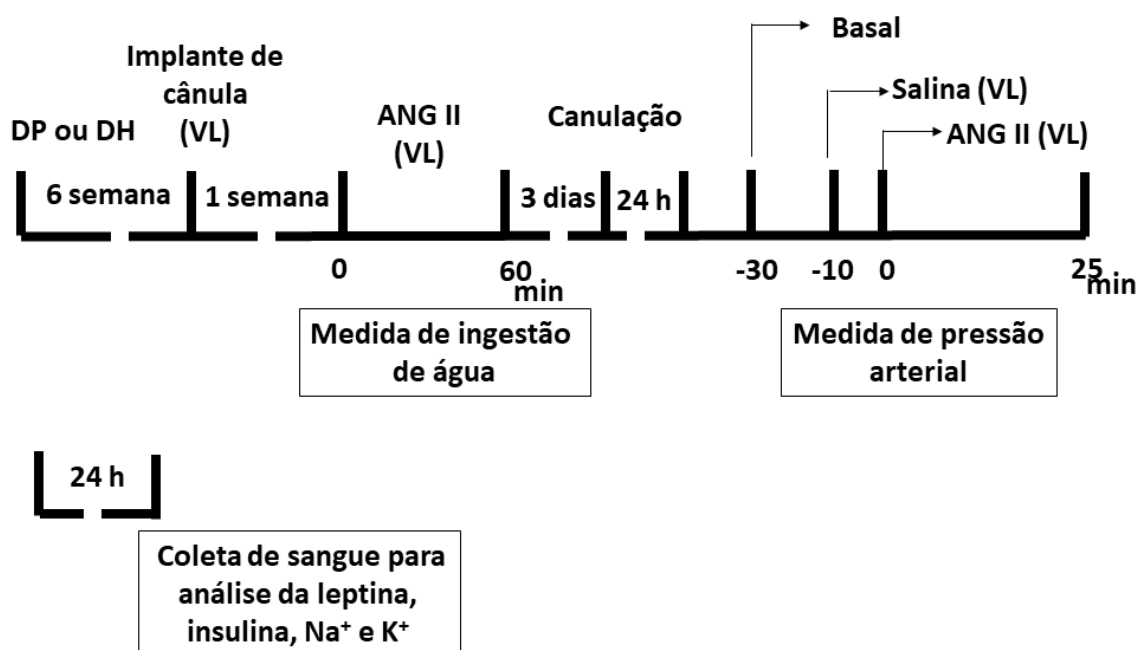


Figura 1: Desenho experimental do protocolo sobre alterações na ingestão de água e PAM induzidas por ANG II (25 ng/1 μ l) no VL de animais alimentados com DP ou DH por 6 semanas.

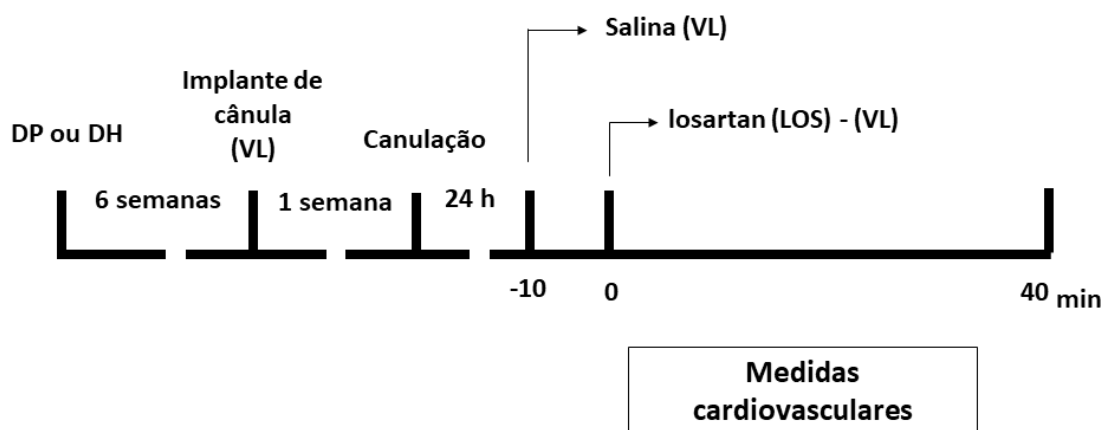


Figura 2: Desenho experimental do protocolo sobre alterações na PAM e FC induzidas por losartan (100 μ g/1 μ l) no VL de animais alimentados com DP ou DH por 6 semanas.

4.2 Efeitos da DH por 6 semanas sobre a expressão do RNAm de componentes do SRA no hipotálamo

Após 6 semanas de DP ou DH, um grupo de animais foram anestesiados com isoflurano, decapitados e tiveram seus hipotálamos retirados a fresco para posterior quantificação do RNAm dos genes de interesse, a saber: receptor de angiotensina II AT1, AT2 e as enzimas ECA e ECA2.

4.3 Efeitos da DH por 6 semanas na sensibilidade à insulina

Após 6 semanas de DP ou DH, um grupo de animais foi submetido a 8 horas de jejum para a realização do TTI conforme descrito na seção de Métodos.

4.4 Efeitos da DH no consumo diário de água e alimento

Um grupo de ratos foi colocado individualmente em suas gaiolas suspensas e após um período basal (3 dias) sendo alimentado com o DP (semana 0), foram aleatoriamente divididos em dois grupos: um grupo recebeu DP e outro recebeu DH por 6 semanas. A ingestão de água e de alimentos foi medida diariamente e realizada uma média dos valores semanalmente, e expressa em ml/100 g de peso corporal (pc). A ingestão de água foi tomada diariamente a partir do período inicial de 3 dias e continuou no final do período experimental (Figura 3). Para verificar se a ingestão de água em animais obesos está relacionada com a umidade do alimento foi utilizado em outro grupo um *pellet* de DH desidratado (umidade similar a DP). Desta forma, tivemos 3 grupos experimentais alimentados por 6 semanas, respectivamente, DP, DH, DH - *pellet* seco. A ingestão diária de água foi medida durante todo o experimento (Figura 4).

Em outro grupo de ratos, após um período basal (3 dias), todos os ratos foram alimentados com DP (semana 0). Posteriormente, os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos: um grupo alimentado com DP por 6 semanas ou DH por 3 semanas seguido por um período de 3 semanas de DP. A ingestão de água foi tomada diariamente e expressa em ml/100 g de pc começando no período basal de 3 dias antes do início e continuado até o final do período experimental (Figura 5). Neste grupo, como os animais não

permaneceram com ração DP ou DH por um período de 6 semanas, não foi feita a medida de peso corporal e a coleta de tecido adiposo no final dos experimentos.



Figura 3: Desenho experimental do protocolo sobre ingestão média de água e ração em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas.



Figura 4: Desenho experimental do protocolo sobre ingestão média de água e ração em ratos alimentados com dieta padrão (DP), dieta hiperlipídica (DH) ou DH *pellet* seco por 6 semanas.

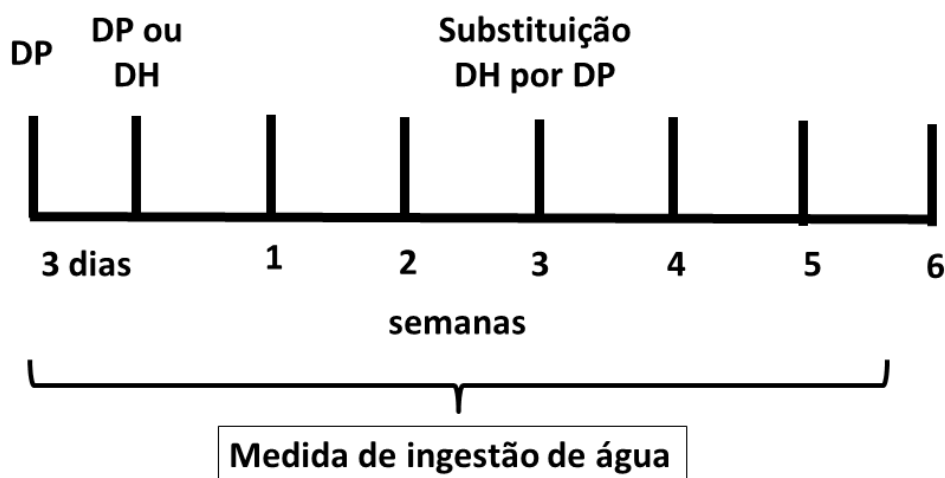


Figura 5: Desenho experimental do protocolo sobre ingestão diária de água em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 3 semanas (DP/DH) e substituída para DP (DH/DP) na 3ª semana.

4.5 Ingestão de água associada à ingestão alimentar em ratos alimentados com DH

Um grupo de ratos após 3 dias de um período basal alimentados com DP, recebeu por mais 3 dias alguns pellets de DP e alguns pellets de DH para habituação. Após esse período, os animais foram mantidos em jejum por 24 h com água *ad libitum* e, após as 24 h, foi feita a remoção das buretas de 100 mL de água e dos pellets. A seguir, os animais foram divididos em dois grupos: um grupo recebeu pellets de DP e outro recebeu pellets DH e buretas de água com divisões de 0,1 ml, e a ingestão de alimento e água foram medidas durante as próximas 4 horas nos tempos de 15, 30, 45, 60, 120, 180 e 240 min. Finalizado o experimentos, os animais receberam novamente uma mistura de pellets de DP e de pellets de DH por 3 dias, e o experimento foi contrabalançado (Figura 6). A ingestão de água e alimentos e a relação de água/alimento foram expressos como, respectivamente, ml/100 g de pc, g/100 g de pc e ml/g/100 pc.

Neste protocolo, como os animais não permaneceram com ração DP ou DH por um período de 6 semanas, não foi feita a medida de peso corporal e a coleta de tecido adiposo no final dos experimentos.

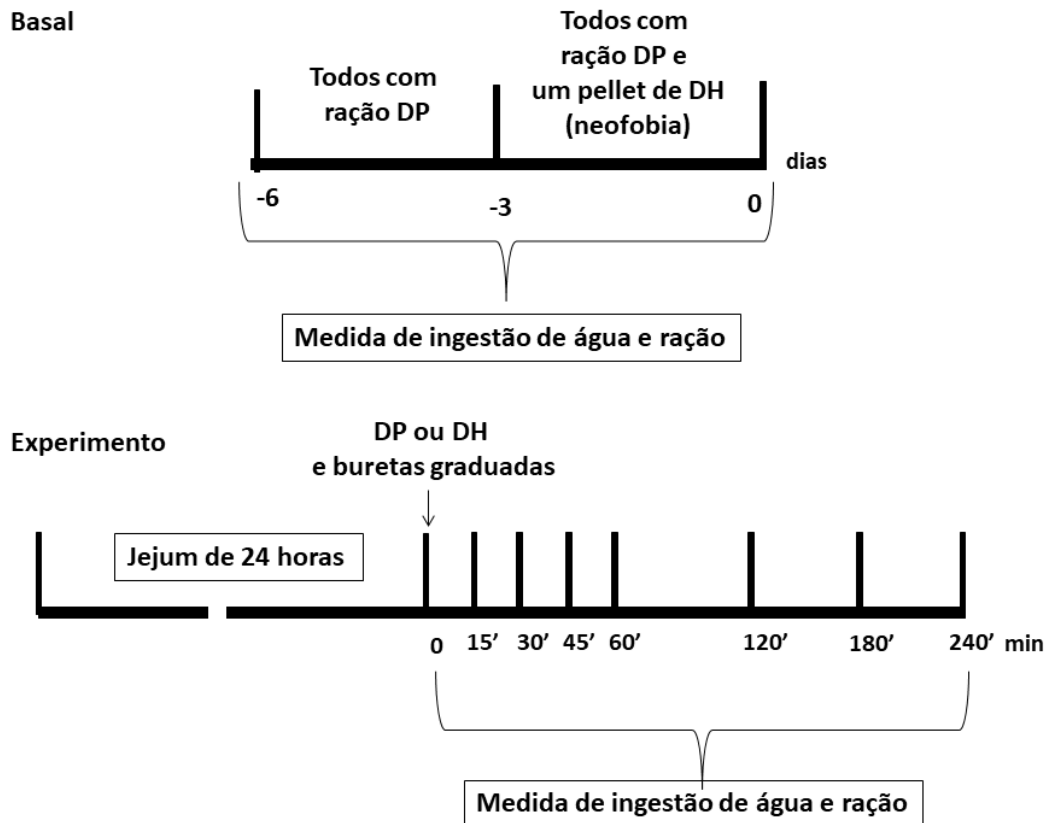


Figura 6: Desenho experimental do protocolo sobre consumo alimentar cumulativo, ingestão de água e relação água/alimento em ratos privados de alimento por 24 horas que receberam DP ou DH no primeiro experimento. (experimento de contrabalanço).

4.6 Efeito da DH na excreção urinária

Um grupo de animais recebeu DP durante a primeira semana de experimento (semana 0), depois disso, os animais foram aleatoriamente separados e foram alimentados com DP ou DH por 6 semanas. Uma vez por semana, a partir da semana 0 (antes da separação dos grupos), os animais foram colocados em gaiolas metabólicas por 24 horas e o consumo de água e excreção urinária foram coletados (Figura 7). O consumo de água e a excreção urinária foram expressos em ml/100 g de pc.

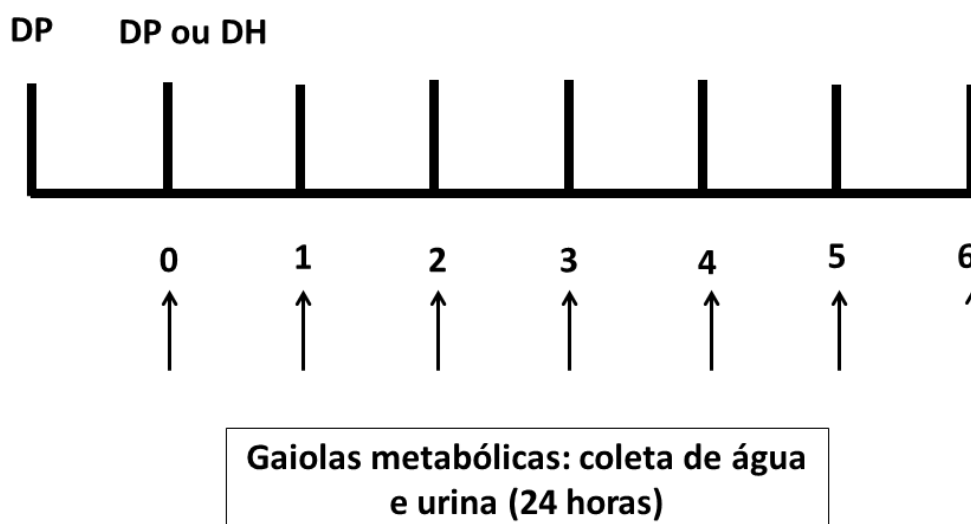


Figura 7: Desenho experimental do protocolo da medida ingestão de água e urina por 24 h antes e durante a alimentação com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas.

5. Resultados

5.1 Peso corporal e perfil metabólico em ratos alimentados com DH

Na tabela 1, podemos verificar que antes do início da dieta, o peso corporal foi semelhante nos grupos DP e DH. Após 6 semanas de DH, houve um maior ganho de peso, aumento da adiposidade com aumento do tecido adiposo epididimal (EPI), mesentérico (MES) e retroperitoneal (RET) comparado com o grupo DP (todos $P < 0,05$, vs DP). Foram também observados maiores níveis de leptina, insulina e glicemia em ratos alimentados com DH quando comparados aos animais DP (todos $P < 0,05$ vs DP). Os resultados do teste de tolerância à insulina (TTI) mostraram menor sensibilidade à insulina após 6 semanas de DH quando comparado ao grupo DP ($P < 0,05$). Ainda, não há diferença na concentração sérica Na^+ (DP: $140,6 \pm 1,5$, vs., DH: $141,1 \pm 1,9$ mEq/ml; $p > 0,05$) ou K^+ (DP: $6,4 \pm 0,3$, vs., DH: $6,2 \pm 0,1$ mEq/ml; $p > 0,05$) entre os grupos.

Tabela 1. Parâmetros metabólicos em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas.

	DP	DH
Massa corporal inicial (g)	295,25 ± 2,31 (n=20)	290,91 ± 4,82 (n=23)
Massa corporal final (g)	406,8 ± 8,40 (n=20)	446,34 ± 8,87* (n=23)
Tecido adiposo epididimal (g/100 g p.c.)	0,5 ± 0,03 (n=24)	1,0 ± 0,01 * (n=31)
Tecido adiposo retroperitoneal (g/100 g p.c.)	0,5 ± 0,04 (n=24)	1,2 ± 0,08 * (n=31)
Tecido adiposo mesentérico (g/100 g p.c.)	0,5 ± 0,05 (n=24)	0,8 ± 0,05 * (n=31)
Leptina (ng/ml)	0,5 ± 0,1 (n=16)	2,5 ± 0,3 * (n=29)
Insulina (ng/ml)	0,6 ± 0,1 (n=12)	2,2 ± 0,3 * (n=29)
Glicemia (mg/dl)	107,3 ± 3,4 (n=4)	119,7 ± 3,4* (n=4)
Kitt (%/min)	2,3 ± 0,18 (n=3)	1,6 ± 0,1* (n=4)

Os valores estão apresentados como média ± erro da média. Teste *t* de Student; * *p* < 0,05 vs. DP. Kitt (%/min): porcentagem de declínio por minuto da concentração de glicose no plasma; p.c.: peso corporal. n= número de animais.

5.2 Mecanismos angiotensinérgicos no prosencéfalo envolvidos com a regulação da pressão arterial e da ingestão de água em ratos alimentados com DH

Em um grupo de ratos, observamos que a ANG II induziu ingestão de água em animais que receberam DP e DH [$F(4,55) = 35,723$; $p < 0,05$], porém o aumento na ingestão de água foi semelhante entre os grupos (Figura 8). Salina não induziu ingestão significativa de água (dados não mostrados).

Nestes mesmos animais, 3 dias após os experimentos de ingestão de água, observamos que o pico de aumento da PAM em resposta à ANG II icv foi semelhante nos ratos DP e DH ($\Delta DP: 20 \pm 4$ vs. $\Delta DH: 21 \pm 3$ mmHg, $p > 0,05$). No entanto, 20 minutos após a injeção, a PAM retornou aos níveis basais nos ratos DP, mas não nos ratos DH [$F(5; 66) = 9,51$; $P < 0,001$], Figura 9. A FCA variou muito após a injeção de ANG II no VL em ambos os grupos, com algumas diferenças pontuais entre os grupos estudados [$F(1,66) = 5,360$; $p < 0,05$], Figura 9. Salina não induziu qualquer alteração na PAM ou FC (Figura 9).

Em outro grupo de animais, observamos que os níveis mais elevados de PAM encontrados em ratos com DH (DH: 115 ± 3 vs DP: 102 ± 4 mmHg; $p < 0,05$) foram reduzidos após a microinjeção aguda losartan icv em ratos DH (DH: 102 ± 3 vs DP: 108 ± 3 mmHg; $p < 0,05$) [$F(2,27) = 4,201$; $p < 0,05$], Figura 10. Em relação à FC, observamos que os ratos DH apresentaram uma FC basal maior que a dos ratos DP (DH = 393 ± 18 , vs DP = 329 ± 6 bpm; $p < 0,05$) e 40 min após o losartan icv os níveis de FC foram comparáveis entre (DH = 345 ± 18 , vs DP = 384 ± 34 bpm; $p > 0,05$), [$F(2,27) = 4,203$ $P < 0,05$], Figura 11.

A Figura 12 mostra o sítio de injeção no VL em um rato representativo dos animais testados no presente protocolo experimental.

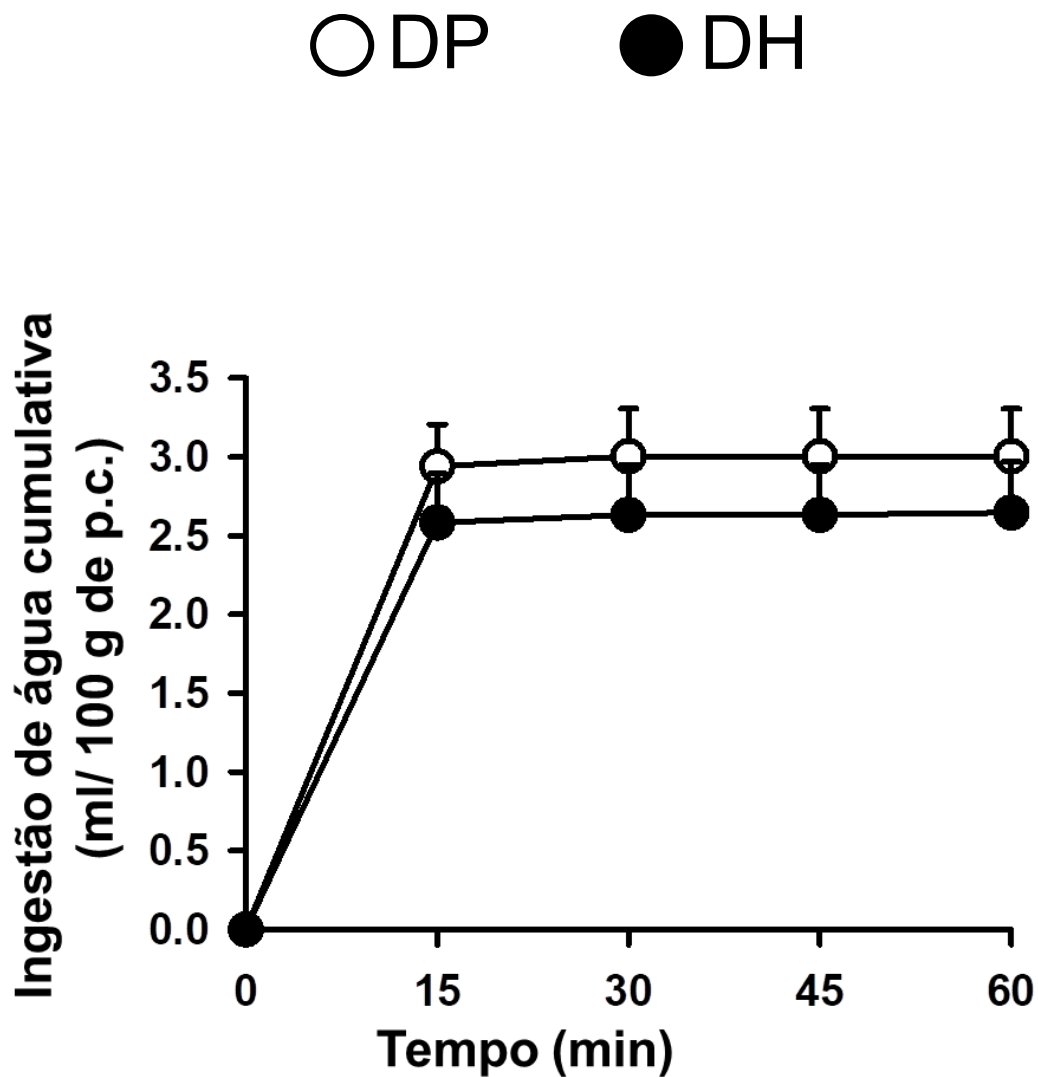


Figura 8: Alterações na ingestão de água induzidas por ANG II (25 ng/1 μ l) injetada no VL de ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas. Os dados são expressos como média \pm EPM; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. DP = 5 e DH = 8.

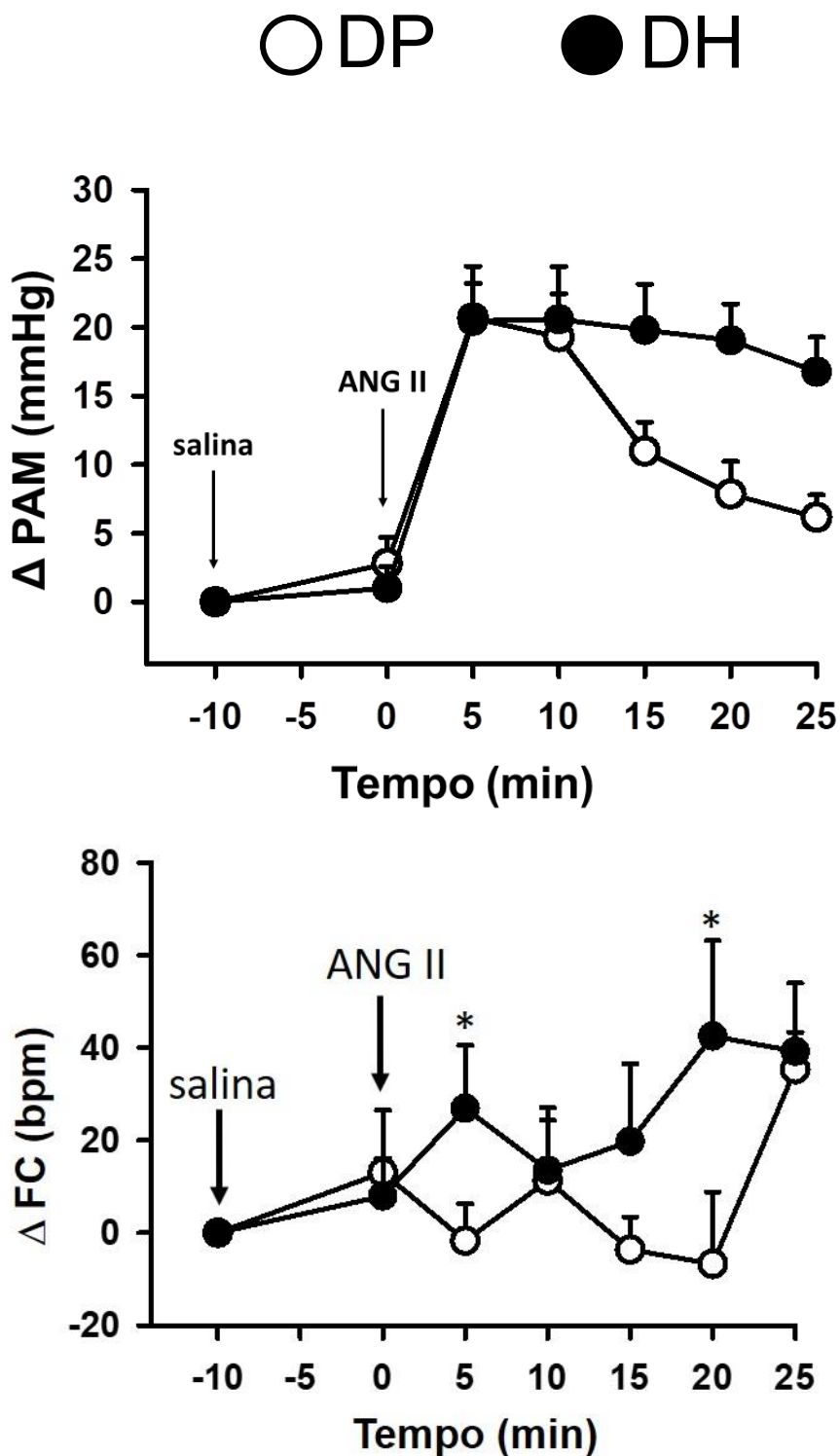


Figura 9: Alterações na pressão arterial média (PAM) e na frequência cardíaca (FC) induzidas por salina ou ANG II (25 ng/1 μ l) no VL de ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas. Os dados são expressos como média \pm EPM; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls; * p < 0,05 vs. DP; DP = 5 e DH = 8.

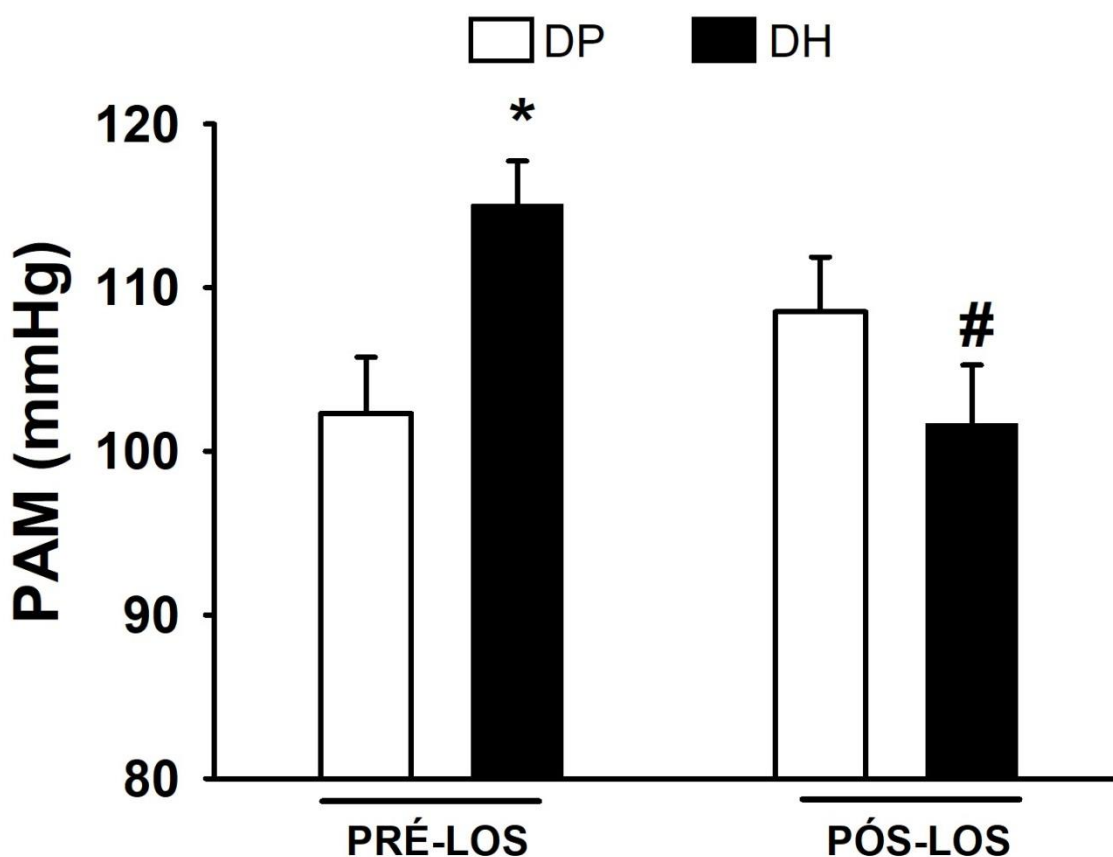


Figura 10: Efeito da microinjeção no VL de losartan ($100 \mu\text{g}/1 \mu\text{l}$), antagonista de receptores AT1, na pressão arterial média (PAM) de ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas. Os dados são expressos como média \pm EPM; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls; * $p < 0,05$ vs. DP; # $p < 0,05$ vs. DH PRÉ-LOS; DP = 5 e DH = 6.

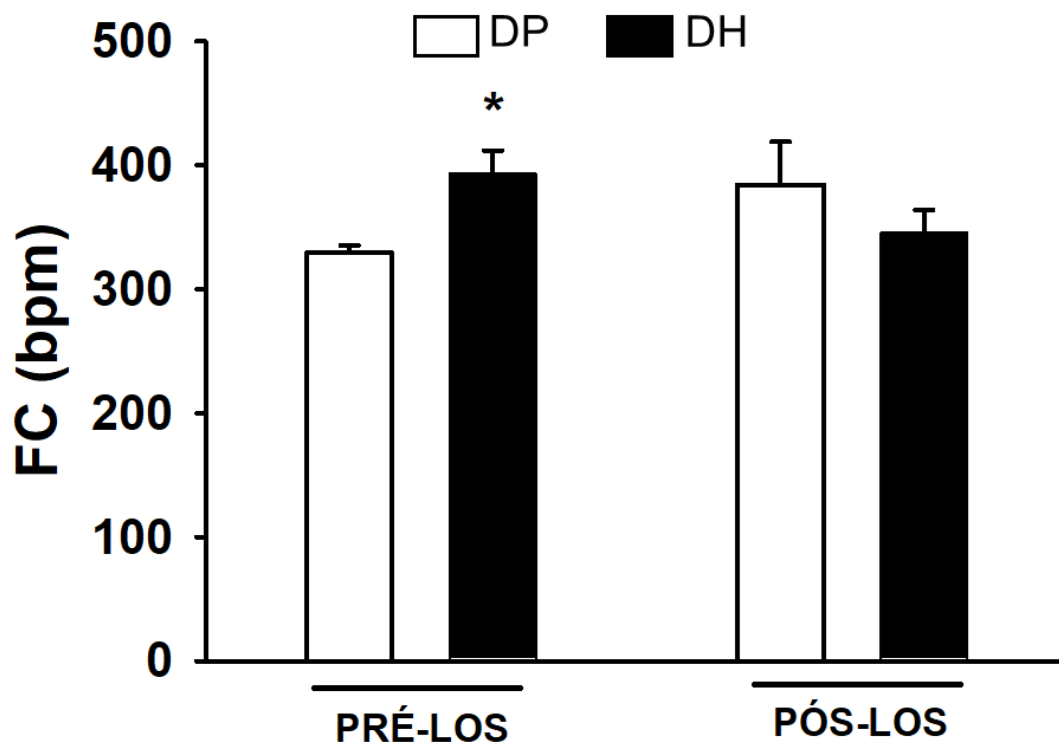


Figura 11: Efeito da microinjeção no VL de losartan (100 $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$), antagonista de receptores AT1, na frequência cardíaca (FC) de ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas. Os dados são expressos como média \pm EPM; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls; * $p < 0,05$ vs. DP; DP = 5 e DH = 6.

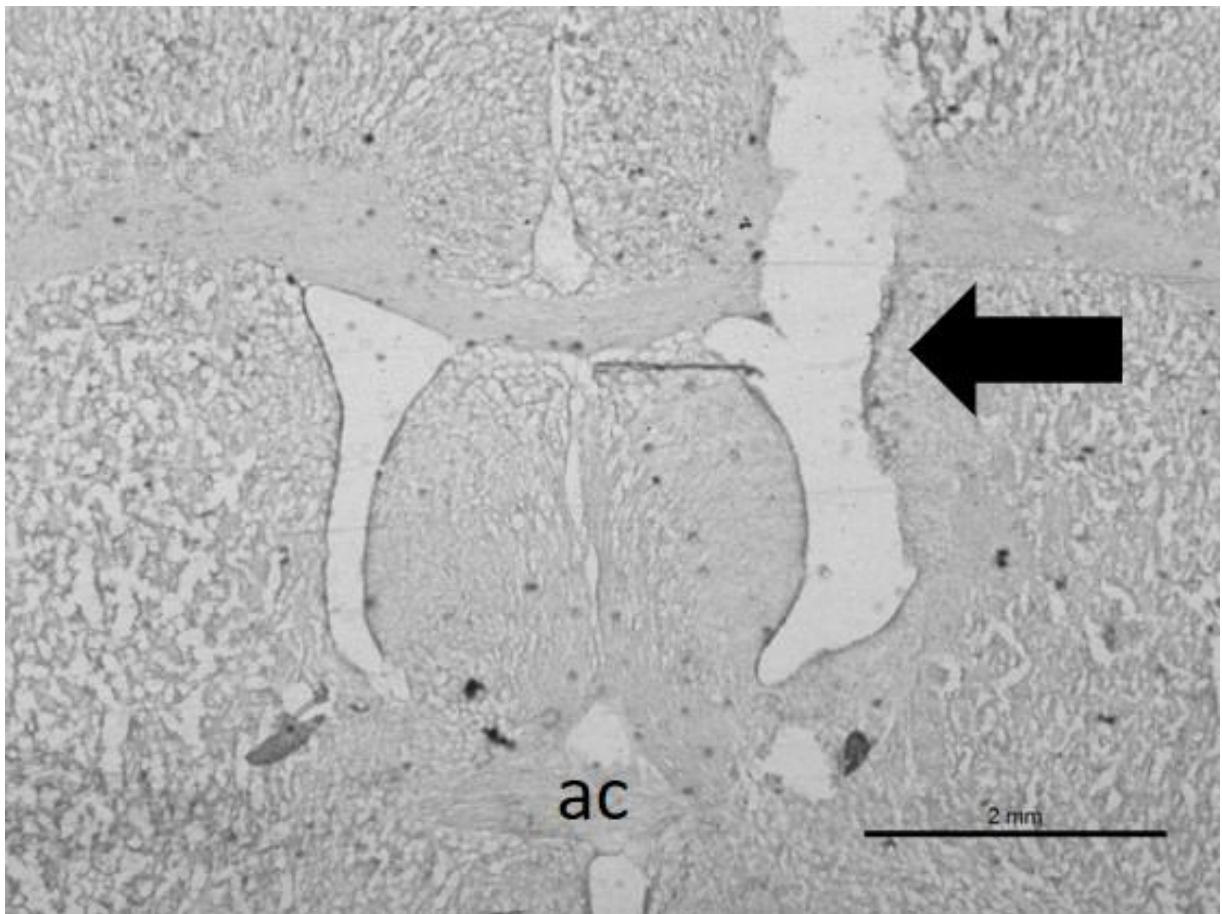


Figura 12: Fotomicrografia de uma seção transversal do encéfalo de um rato representativo dos grupos mostrando o local da microinjeção no VL (seta); ac = comissura anterior; escala = 2 mm.

5.3 Efeito da DH por 6 semanas sobre a expressão gênica no hipotálamo

Em ratos alimentados com DH por 6 semanas não observamos alteração no hipotálamo na expressão de RNAm dos receptores AT1 ($P = 0,376$, vs DP) e AT2 ($P = 0,461$, vs DP), figura 13A e 13B, respectivamente, bem como das enzimas ECA ($P = 0,628$, vs DP) e ECA2 ($P = 0,369$, vs DP). Figura 13C e 13D, respectivamente.

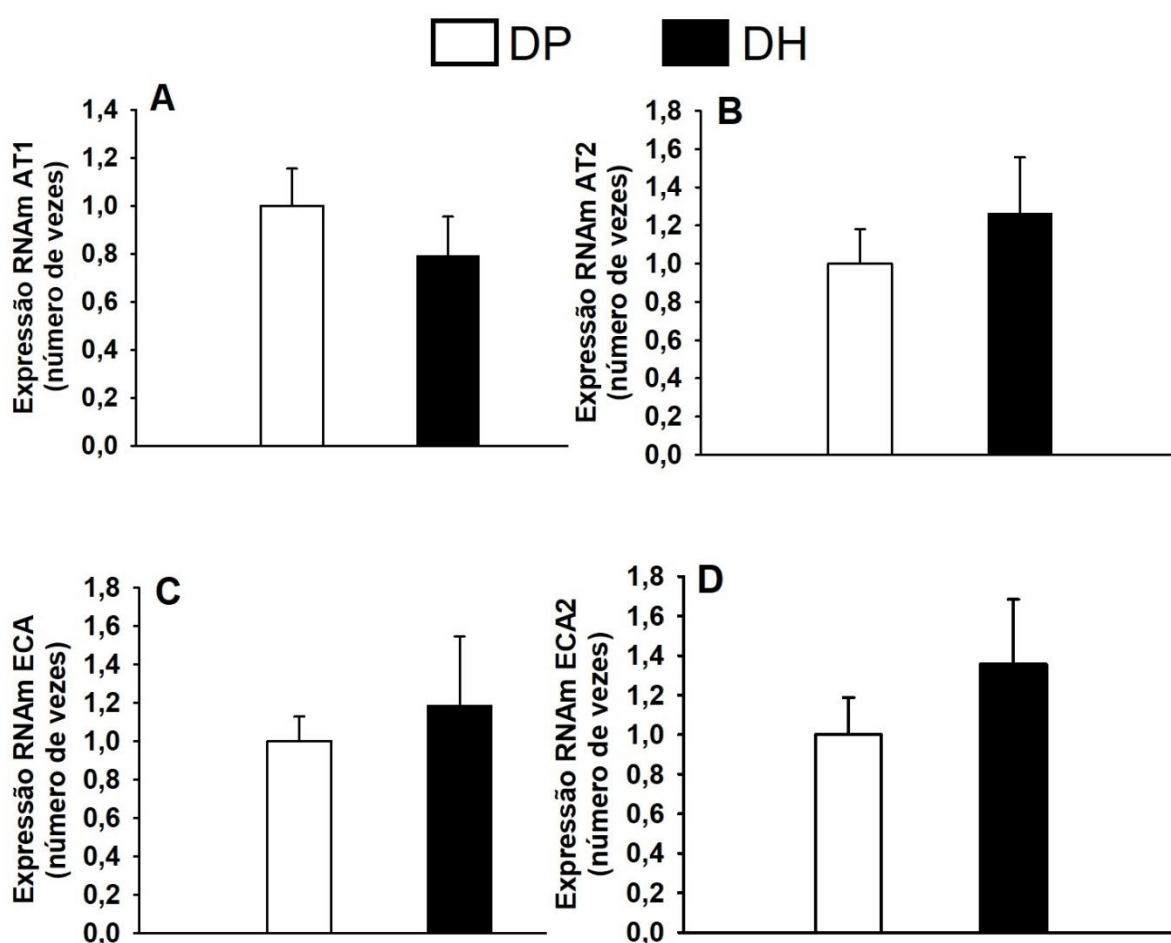


Figura 13: Expressão do RNAm no hipotálamo do (A) receptor AT1, (B) receptor AT2, (C) enzima conversora de angiotensina (ECA), e (D) enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas. Os dados são expressos como média \pm EPM, teste *t* de Student; DP = 6 e DH = 6.

5.4 Consumo diário de água e alimento em ratos alimentados com DH

Ratos alimentados com DH por 6 semanas mostraram uma redução na ingestão de água durante todo o período experimental [$F(1,56) = 506,404$; $P < 0,001$], Figura 14. Os animais alimentados com DH tiveram uma maior ingestão de alimentos durante a primeira semana em comparação com os ratos alimentados com DP e, depois a ingestão de alimentos em DH foi diminuída comparada com ratos alimentados com DP até o final do período experimental [$F(1,56) = 17,863$; $P < 0,001$] Figura 15. Apesar disso, a ingestão de calorias foi maior em ratos DH em comparação com os alimentados com DP [$F(1,56) = 128,787$; $P < 0,001$], Figura 16.

Para verificar ainda mais os efeitos da DH na ingestão de água, observou-se que no dia seguinte à introdução da DH, a ingestão diária de água foi drasticamente reduzida (DP/DH). Além disso, assim que mudamos a DH para DP em ratos alimentados com DH (DH/DP), a ingestão de água retornou para os níveis de DP permanecendo nesse nível até o final do período de registro [$F(1,154) = 255,983$; $P < 0,001$], Figura 17.

Considerando que a ração DH utilizada neste trabalho tem umidade maior do que a ração DP, para descartar algum efeito da umidade da ração DH estar interferindo na ingestão diária de água, realizamos um experimento com uma DH com umidade semelhante à DP e composição igual à DH, denominada DH - *pellet seco*. Podemos verificar que os animais alimentados com essa ração também apresentaram redução no consumo de água ao longo de 6 semanas comparado com os ratos DP, e em níveis semelhantes aos animais que se alimentaram com DH [$F(2,102) = 61,035$; $P < 0,001$], Figura 18.

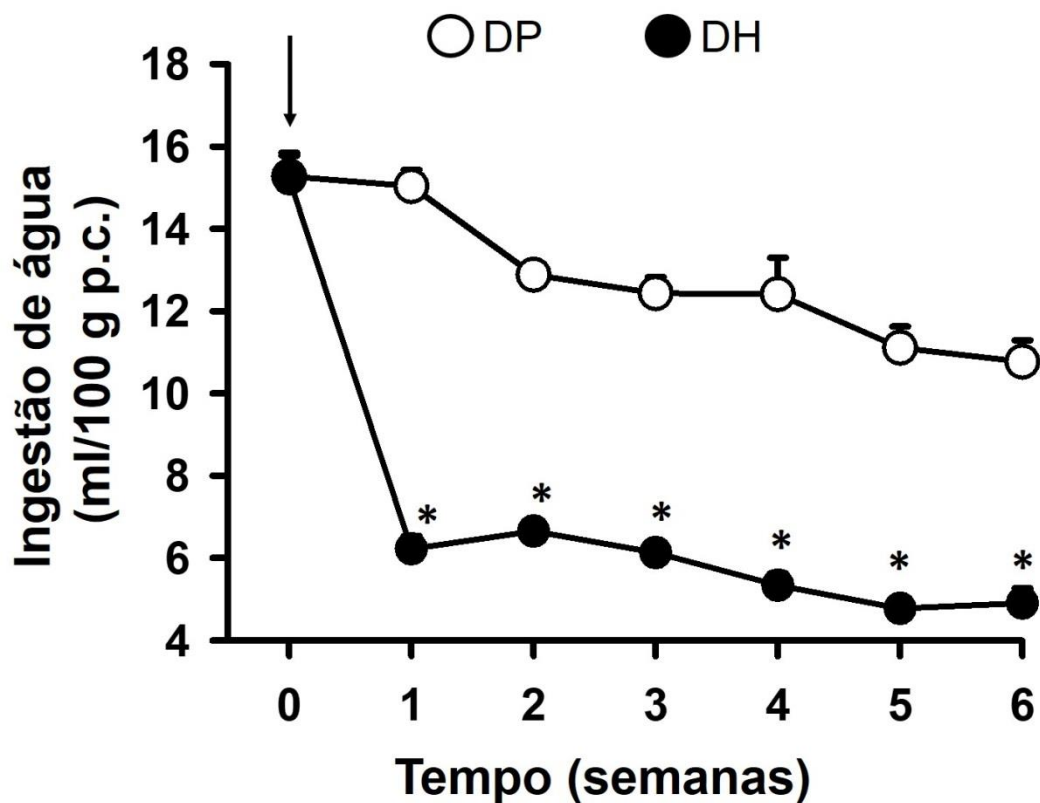


Figura 14: Média semanal da ingestão diária de água em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas. A seta indica que no tempo 0 os animais estavam todos com DP. Os dados são expressos como média \pm EPM; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls; * $p < 0,05$ vs. DP; DP = 5 e DH = 5.

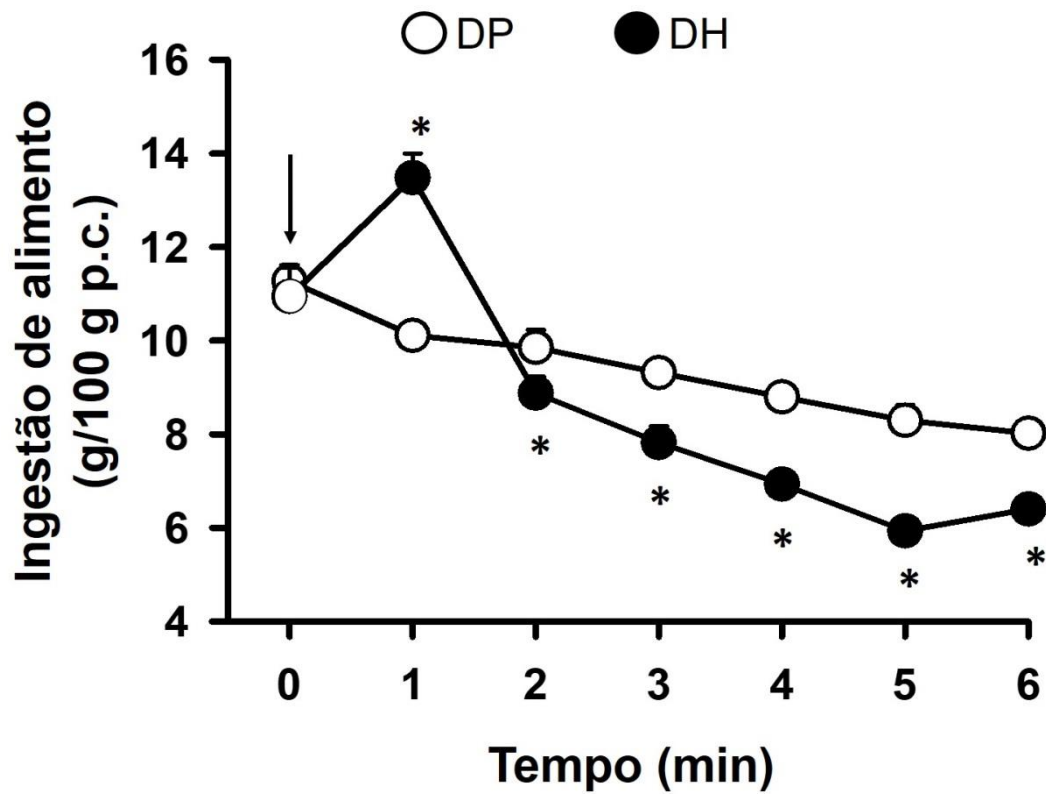


Figura 15: Média semanal da ingestão diária de alimento em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas. A seta indica que no tempo 0 os animais estavam todos com DP. Os dados são expressos como média \pm EPM; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls; * $p < 0,05$ vs. DP. DP = 5 e DH = 5.

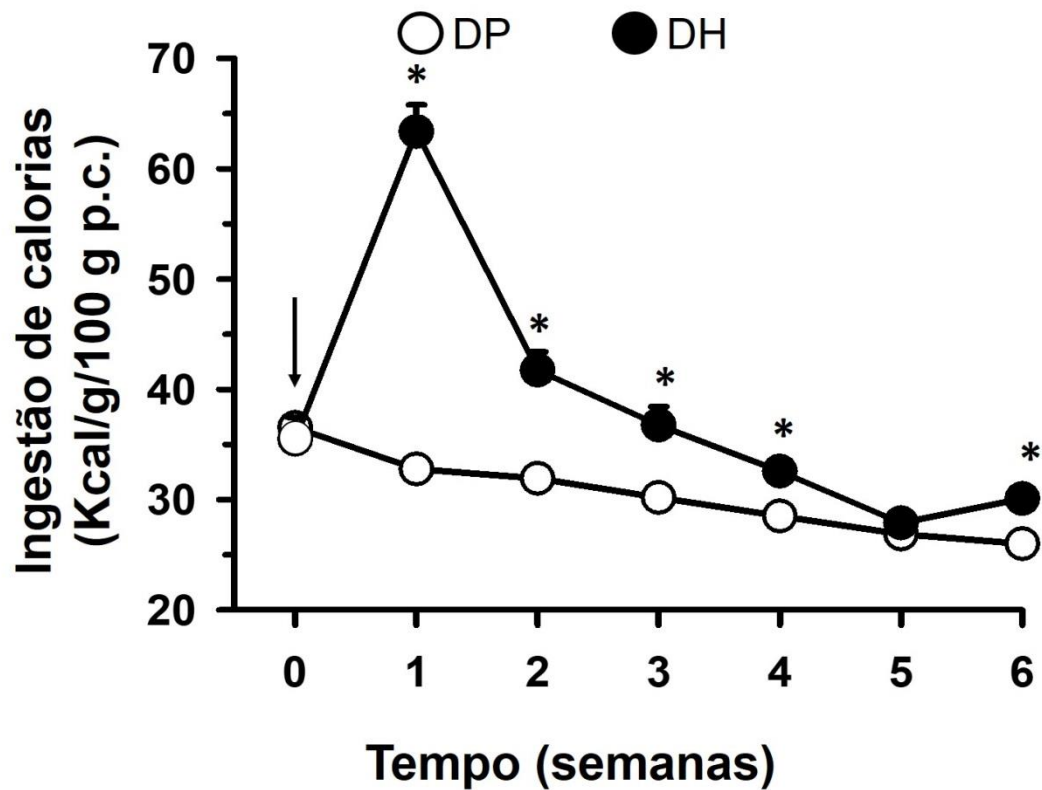


Figura 16: Média semanal de ingestão de calorías em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas. A seta indica que no tempo 0 os animais estavam todos com DP. Os dados são expressos como média \pm EPM; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls; * $p < 0,05$ vs. DP. DP = 5 e DH = 5.

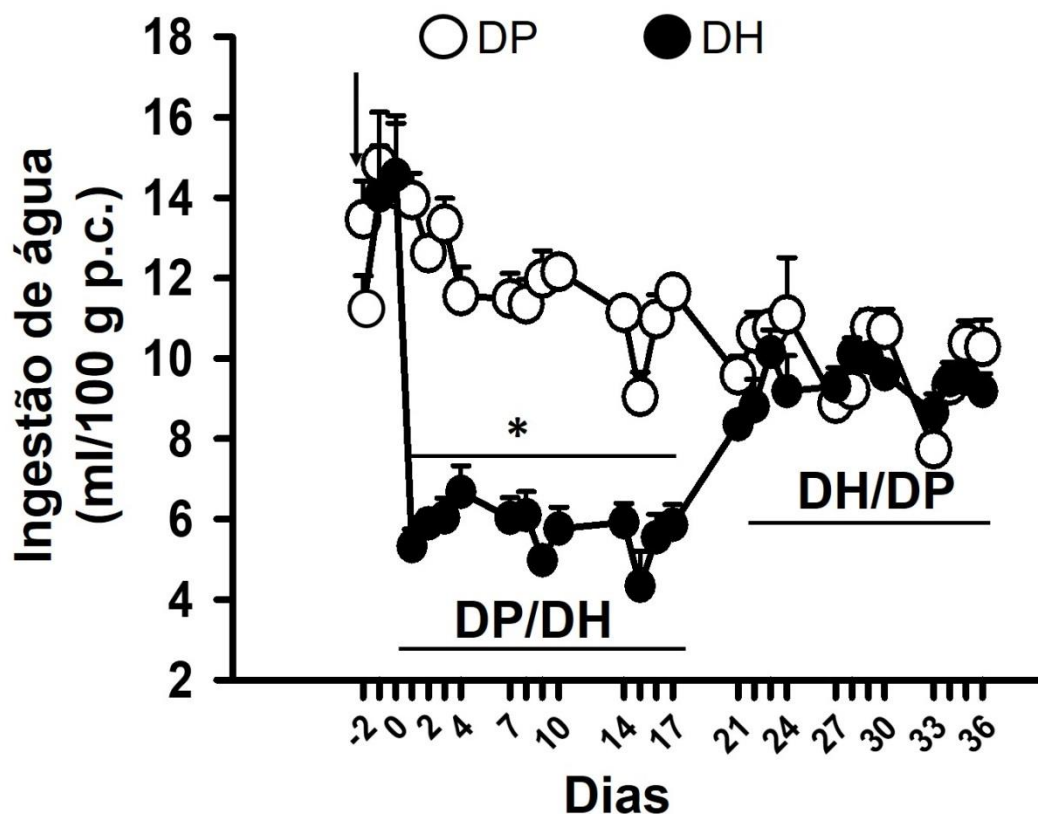


Figura 17: Ingestão diária de água em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 3 semanas (DP/DH) e substituída para DP (DH/DP) na 3ª semana para os ratos DH. A seta indica que no tempo 0 os animais estavam todos com DP. Os dados são expressos como média \pm EPM; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls; * $p < 0,05$ vs. SD. DP = 5 e DH = 5.

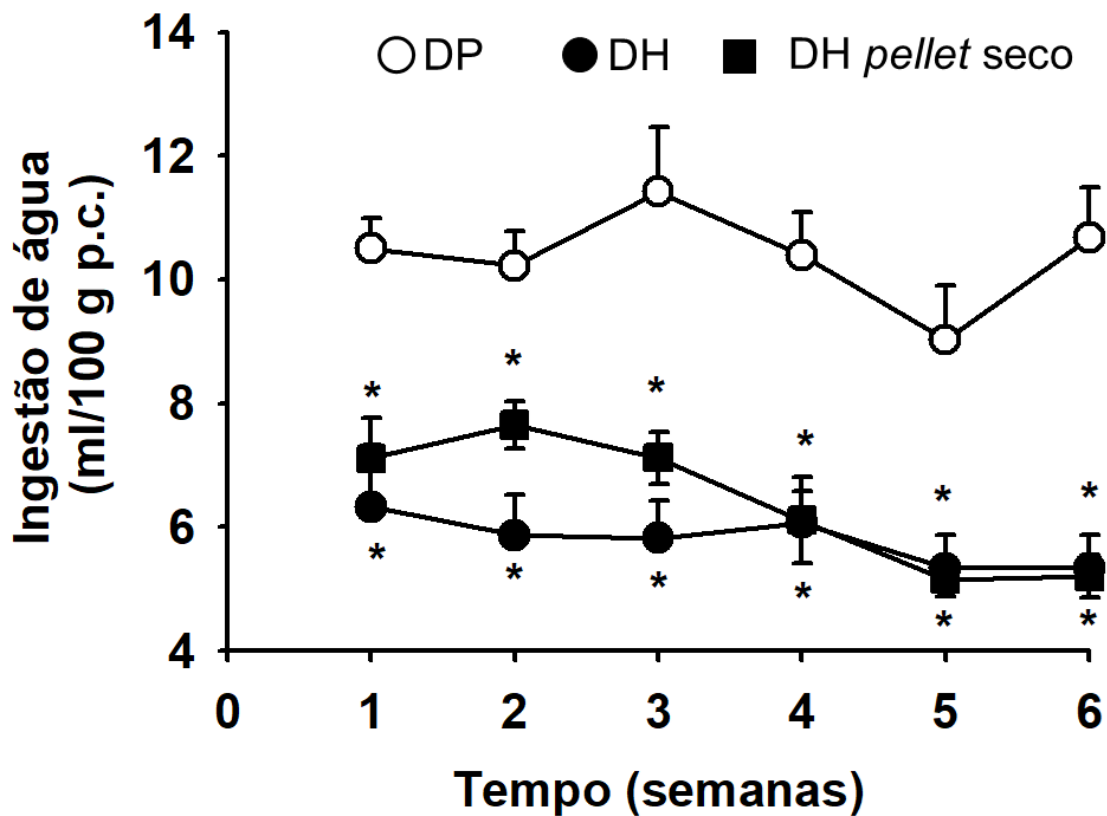


Figura 18: Média semanal da ingestão diária de água em ratos alimentados com dieta padrão (DP), dieta hiperlipídica (DH) ou DH *pellet* seco por 6 semanas. Os dados são expressos como média \pm EPM; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls; * $P < 0,05$ vs. DP; DP = 5; DH = 10 e DH *pellet* seco = 5.

5.5 Ingestão de água associada à ingestão alimentar em ratos alimentados com DH

Neste experimento, todos os animais receberam DP e foram apresentados com um pellet de DH por alguns dias antes da privação de alimento de 24 h, mas com garrafas de água disponíveis *ad libitum*. Em seguida, metade do grupo teve acesso a DH e a outra metade a DP pelas próximas 4 h (240 min). No primeiro turno do teste, obtivemos que os animais que tiveram acesso aos pellets de DH, o consumo alimentar no período de 4 h foi maior do que a observada nos animais que tiveram pellets DP [$F(1,64) = 244,993$; $p < 0,001$], Figura 19A. Além disso, o animal que teve acesso aos pellets de DH durante o período experimental ingeriu menos água do que os animais que tiveram acesso aos pellets DP [$F(1,64) = 129,0506$; $p < 0,003$], Figura 19B, resultando em uma menor relação água / alimento em ratos que tiveram acesso a DH [$F(1,64) = 9,496$; $p < 0,001$], Figura 19C. No segundo turno do teste, 3 dias depois, o experimento foi contrabalançado, e os animais que tiveram acesso a DH aumentaram o consumo alimentar [$F(1,64) = 9,496$; $P < 0,003$], Figura 20A, e uma tendência a diminuir a ingestão de água ($P = 0,057$), Figura 20B. No entanto, os ratos alimentados com DH apresentaram uma menor relação de ingestão de água/alimento em comparação com os animais que receberam DP [$F(1,64) = 294,047$; $p < 0,003$], Figura 20C.

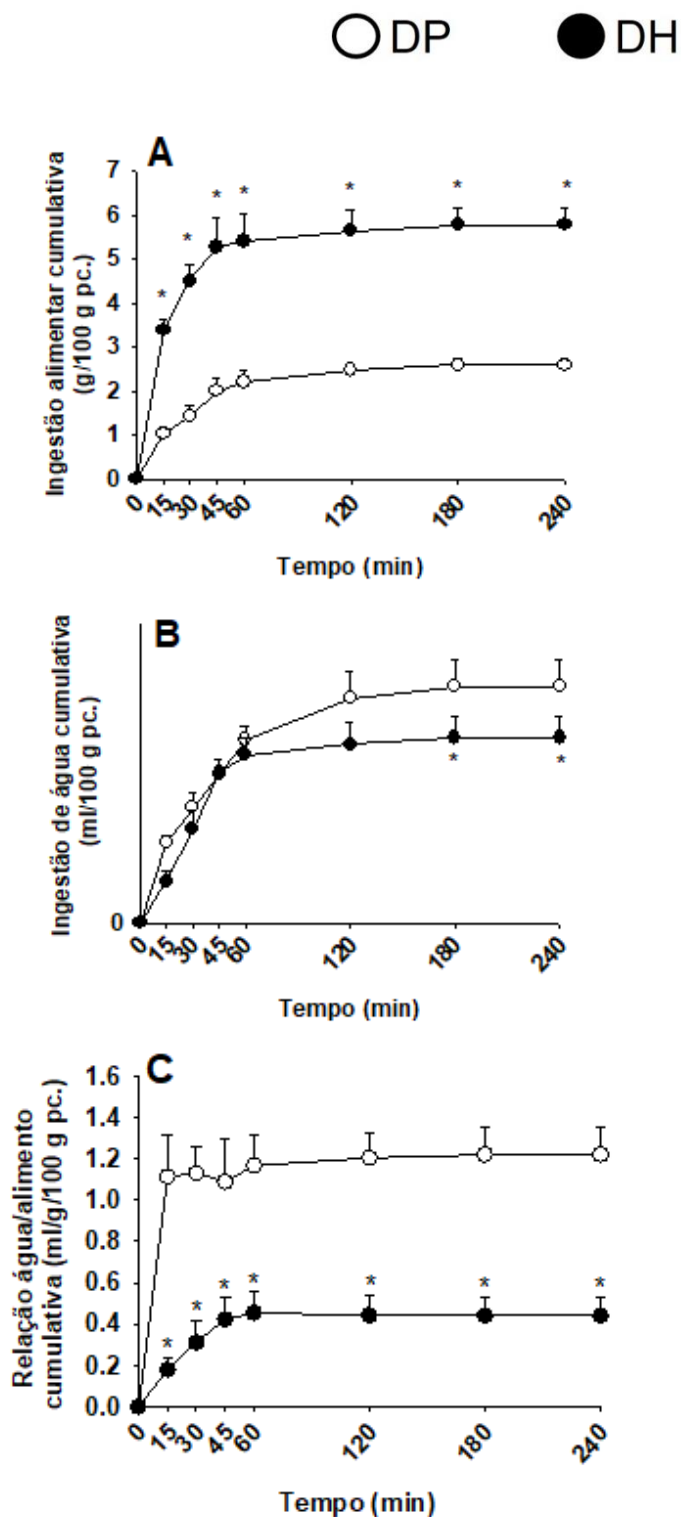


Figura 19: Ingestão cumulativa e concomitante de (A) dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) e (B) água em ratos submetidos a 24 h de privação de alimento. Em (C) está representado a relação água/alimento. Os dados são expressos como média \pm EPM; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls; * $p < 0,05$ vs. DP; DP = 5 e DH = 5.

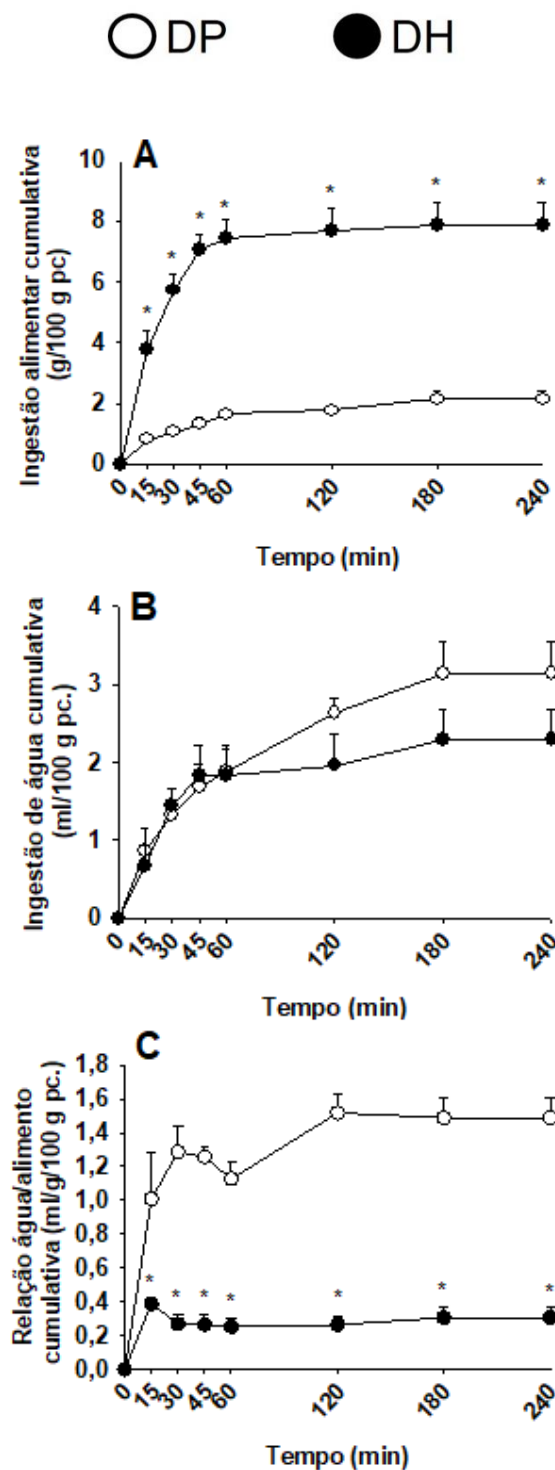


Figura 20: Ingestão cumulativa e concomitante de (A) dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) e (B) água em ratos submetidos a 24 h de privação de alimento. Teste de contrabalanceamento. Em (C) está representado a relação água/alimento. Os dados são expressos como média \pm EPM; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls; * $p < 0,05$ vs. DP; DP = 5 e DH = 5.

5.6 Excreção renal em ratos alimentados com DH

O volume urinário foi diminuído em ratos DH em comparação com DP [F(1,56) = 67,474; $p < 0,001$] (Figura 21A) em paralelo com a diminuição da ingestão de água observada em ratos com DH [F(1,56) = 196,873; $p < 0,001$] (Figura 21B). Não houve diferença significativa na excreção de sódio entre os ratos DH e DP ao longo das 6 semanas do período de experimento (Figura 21C), mas foi observado uma redução significativa na excreção de potássio também nos ratos DH [F(1,56) = 196,873; $p < 0,001$], Figura 21D.

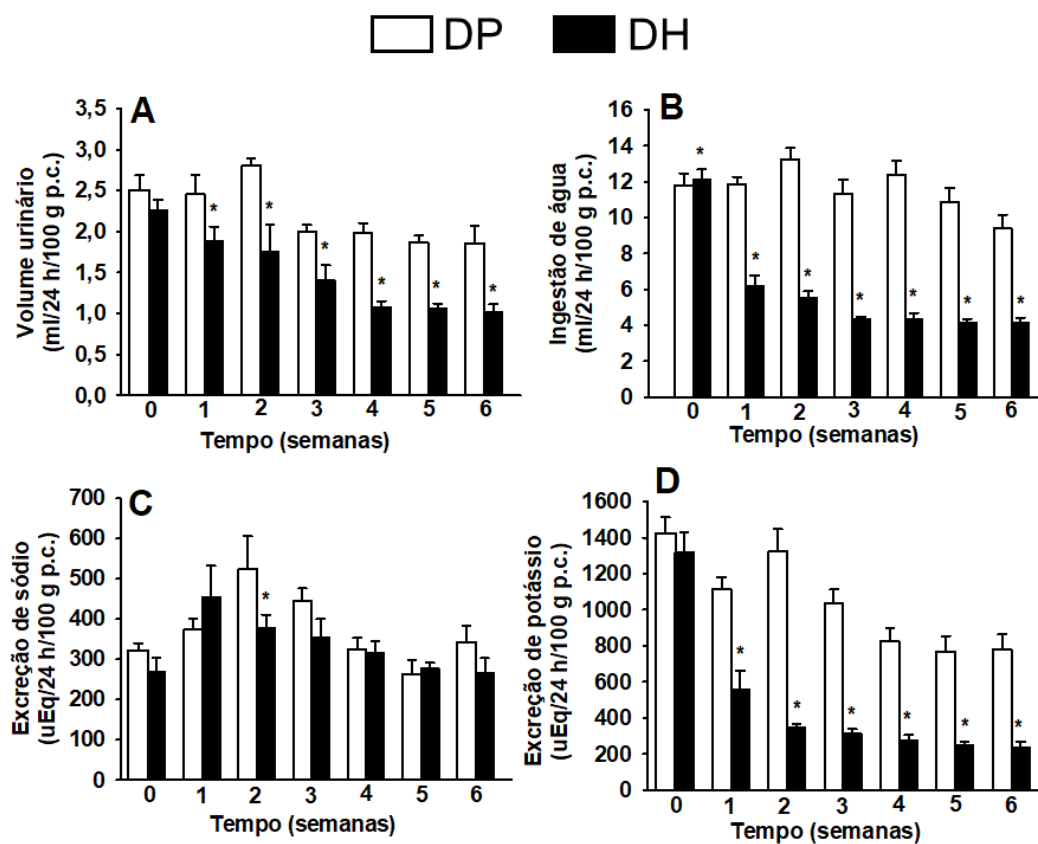


Figura 21: Valores de (A) volume urinário, (B) ingestão de água, (C) excreção de sódio, (D) excreção de potássio medidos por 24 h uma vez por semana durante 6 semanas em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH). Os dados são expressos como média \pm EPM; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls; * $p < 0,05$ vs. DP; DP = 5 e DH = 5.

6. Discussão

Nossos dados demonstraram que com 6 semanas de DH houve um aumento significativo na PAM e FC, uma resposta pressora sustentada à ANG II, caracterizando uma maior potencialização para ANG II. Possivelmente, os níveis mais elevados de PAM na DH é devido a superativação do SRA em animais alimentados por essa dieta com uma maior atuação da ANG II nos receptores AT1. Observamos também que a ingestão diária de água, volume urinário e excreção de potássio foram significativamente reduzidos em ratos com DH, enquanto não houve alterações significativas na excreção de sódio em comparação com os ratos com DP. Além disso, a relação água/alimento é menor na DH do que na DP. Similarmente ao que foi observado anteriormente em nosso laboratório (Speretta *et al.*, 2016; Speretta *et al.*, 2018; Speretta *et al.*, 2019), os animais com DH apresentaram aumento do peso corporal e do tecido adiposo e na concentração sérica de insulina, leptina. Ademais, os animais alimentados com DH durante 6 semanas apresentaram uma maior concentração de glicemia sanguínea além de menor sensibilidade à insulina demonstrada através do TTI comparada aos animais que receberam DP. As concentrações séricas de Na^+ e K^+ são comparáveis entre os grupos.

Os presentes dados demonstraram que com 6 semanas de DH os animais apresentaram uma potencialização da resposta pressora durante um maior tempo em resposta a injeção icv de ANG II, o que pode ser comparável a estudos anteriores que demonstraram que, embora 3 semanas de DH não tenham causado alteração na PAM, promoveram uma sensibilização de uma dose subpressora de ANG II injetada periféricamente por 14 dias (Xue *et al.*, 2016). Existe algumas diferenças entre nosso e o estudo de Xue e cols (Xue *et al.*, 2016). Enquanto no estudo de Xue e cols (2016) os autores infundiam uma dose subpressora de ANG II periféricamente em ratos DH, no presente estudo realizamos um único insulto de ANG II icv, em dose pressora. Xue e cols. (2016) sugerem que a sensibilização aos efeitos da ANG II em ratos DH possa ser devida à maior expressão de receptores AT1 presentes na lâmina terminal em ratos DH, que compreende as regiões do órgão subfornicial (OSF) e o órgão vasculoso da lamina terminal (OVLT), regiões estas, ricas em receptores AT1 e livres de barreira hematoencefálica (Mckinley e Johnson, 2004). Em nosso estudo e em outros (De Kloet *et al.*, 2014), considerando o hipotálamo,

que é uma região bem maior do que a lâmina terminal, não verificamos aumento da expressão gênica de receptores AT1. É possível, que, se analisássemos apenas a lâmina terminal, também víssemos alterações. Mesmo sem esse dado mais específico, ou de sabermos que mesmo sem o aumento do número de receptores, talvez os mecanismos intracelulares possam estar mais ativados em ratos DH, é concebível que a potencialização da resposta pressora à ANG II central em ratos DH possa ter como efetores uma maior liberação de vasopressina e maior ativação (por tempo maior) do sistema nervoso simpático, ambos importantes para a resposta pressora à ANG II central (Hoffman *et al.*, 1977; Chen *et al.*, 2011). Experimentos futuros usando bloqueadores da vasopressina ou analisando-se a atividade simpática nessa situação poderão elucidar essa questão.

Surpreendentemente, a potencialização não parece estar presente na ingestão de água induzida pela ANGII central, e a razão para tal efeito pode estar relacionado com a interação entre a pressão arterial e a ingestão de água. Estudo de Evered (Evered, 1992), demonstrou que a infusão i.v. de ANG II leva a aumento ingestão de água e da pressão arterial. Neste mesmo estudo, foi observado que a injeção de isoproterenol, um vasodilatador, concomitantemente à administração de ANG II, promoveu um menor aumento da pressão arterial e um maior aumento da ingestão de água, sugerindo assim, um efeito inibitório do aumento da pressão arterial na ingestão de água estimulada por ANGII. Como em ratos DH obtivemos uma resposta pressora durante todo o período de registro de ingestão de água, pode ser que, por conta da manutenção da pressão arterial em níveis mais altos os animais DH não tiveram uma potencialização da resposta dipsogênica à ANG II.

Observamos que ratos alimentados com DH por 6 semanas, a injeção icv de losartan promoveu uma redução na PAM basal de ~ 10 mmHg e esse efeito foi observado apenas em ratos com DH. Considerando que a DH leva a um aumento da atividade do SRA (Boustany *et al.*, 2004), e que pelo menos em regiões específicas da lâmina terminal há o aumento da expressão de receptores AT1 (De Kloet *et al.*, 2014; Xue *et al.*, 2016), podemos supor que esse aumento de PAM basal em ratos DH é mediado por uma maior ativação de receptores AT1 nas regiões da lâmina terminal. As regiões do prosencéfalo, como o OSF e OVLT, projetam-se direta ou indiretamente para a medula

rostromedial (RVL), onde o principal grupo de neurônios pré-motores simpáticos está localizado (Guyenet, 2006) e dados da literatura mostram que a RVL é mais ativo em animais submetidos à DH (Stocker *et al.*, 2007). Os dados obtidos no presente trabalho vêm a somar com outros estudos que mostram que o bloqueio dos receptores AT1 periféricamente reduz o aumento da PAM em ratos obesos (Boustany *et al.*, 2005) e que o bloqueio de receptores AT1 do NTS também reduz a pressão arterial em ratos obesos (Speretta *et al.*, 2019). Sendo assim, é possível que os níveis mais altos de ANG II circulante atuem em regiões do SNC livres da barreira hematoencefálica do prosencéfalo, ou mesmo em regiões encefálicas que contenham a barreira hematoencefálica, já que esta apresenta-se prejudicada durante a obesidade (Mauro *et al.*, 2014; Ramalho *et al.*, 2018). Finalmente, vale ressaltar que a obesidade é uma doença multifatorial, e a hiperleptinemia e hiperinsulinemia observadas em ratos alimentados com DH podem contribuir para o aumento da PAM (Hall *et al.*, 2015). A insulina e leptina atuando no prosencéfalo aumentam a atividade do sistema nervoso simpático, e portanto, da pressão arterial e uma interação entre ANG II, leptina, e insulina foi relatada no prosencéfalo (Muntzel *et al.*, 1994; Mark *et al.*, 2009; Hilzendeger *et al.*, 2012; Mayer *et al.*, 2013; Xue *et al.*, 2016). Apesar disso, os presentes resultados revelaram um envolvimento pronunciado do receptor AT1 do prosencéfalo nas alterações cardiovasculares observadas após 6 semanas de alimentação na DH.

Observamos que ratos alimentados com DH apresentaram uma redução da ingestão diária de água, e essa redução é muito rápida aparecendo 24 h após a introdução do alimento hiperlipídico (Figura 17). Neste mesmo experimento, 24 h após terem a DH trocada por DP, os animais DH tiveram a ingestão de água comparável aos ratos DP. Mais ainda, a ingestão prandial de água, ou seja, àquela relacionada com a ingestão de alimento, estava diminuída nos ratos que tiveram acesso apenas a DH (Figuras 19 e 20). Já é bem conhecido que animais que ingerem alimentos secos bebem água enquanto comem, este comportamento observado pelo grupo do Dr. Epstein foi chamado de ingestão prandial de água (Teitelbaum e Epstein, 1962; Epstein *et al.*, 1964). A ingestão prandial de água parece ser uma resposta à boca e faringe secas produzida por alimentos secos, pois ratos salivarectomizados, tem uma ingestão de água

aumentada durante as refeições comparada com o estado pré-operatório (antes da remoção das glândulas salivares) e a ingestão de água retornou ao normal quando uma dieta líquida, ao invés de “*pellets*” secos, foi ingerida (Epstein *et al.*, 1964). Esses resultados sugerem assim, que a porcentagem de umidade do alimento pode interferir na quantidade de água ingerida durante as refeições refletindo em variações na ingestão total de água diária. Uma vez que a ingestão prandial de água parece ser uma resposta à boca seca e faringe produzida por alimentos secos (Epstein *et al.*, 1964), e os pellets da dieta DH são mais hidratados que os pellets DP (~10% vs 22% of DH), o presente trabalho demonstrou que o consumo diário de água em animais que receberam a mesma DH, mas com uma redução na porcentagem de umidade (DH - *pellet* seco), apresentou valores semelhantes de ingestão de água àqueles observados em animais que receberam ração DH mais úmida. Portanto, outros mecanismos além da umidade no alimento podem estar interferindo na redução da ingestão de água nos ratos alimentados com DH.

Um mecanismo que pode estar envolvido é a inibição da ingestão de água induzida por citocinas inflamatórias (revisão em (De Luca *et al.*, 2016)). A obesidade é considerada por muitos autores um estado pró-inflamatório em que a hipertrofia do tecido adiposo bem como de células imunes contribuem para o aumento de citocinas pró-inflamatórias (Asghar e Sheikh, 2017). Entre estas, destacam-se moléculas pró-inflamatórias secretadas pelo adipócito maduro como interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1- β (Despres e Lemieux, 2006; Asghar e Sheikh, 2017). Na obesidade há um aumento de citocinas pró- inflamatórias tanto em áreas periféricas (Speretta *et al.*, 2012; Asghar e Sheikh, 2017) como no SNC (Thaler *et al.*, 2012; De Kloet *et al.*, 2014; Speretta *et al.*, 2016; Xue *et al.*, 2016; Speretta *et al.*, 2019), e ainda, no SNC há ativação de células imunes residente, tais como micróglia, e há astrogliose (De Kloet *et al.*, 2014; Speretta *et al.*, 2019). No SNC, o aumento RNAm que codificam alguns mediadores como IL-6 e TNF- α podem ocorrer nas primeiras 24h da exposição à dieta (Thaler *et al.*, 2012), ou seja, é um processo muito rápido. Dados recentes da literatura demonstraram uma interação entre o SRA e o sistema imune no SNC durante a obesidade (De Kloet *et al.*, 2014; Speretta *et al.*, 2016; Xue *et al.*, 2016; Speretta *et al.*, 2019). De fato, ratos ou camundongos alimentados com

DH além de aumentarem a expressão gênica de componentes do SRA, como o receptor AT1 e a ECA, no prosencéfalo e bulbo, aumentam a expressão de diversas citocinas inflamatórias (De Kloet *et al.*, 2014; Speretta *et al.*, 2016; Xue *et al.*, 2016; Speretta *et al.*, 2019). Além disso, a infusão intracerebroventricular (icv) de pentoxifilina, um inibidor da síntese da citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral- α (TNF- α) atenua o aumento da expressão de citocinas inflamatórias e do receptor AT1 na lâmina terminal (Xue *et al.*, 2016), região livre de barreira hematoencefálica e rica em receptores AT1 em que a ANG II central e periférica podem atuar (Mckinley e Johnson, 2004). É interessante observar que a injeção central de IL-6 e TNF- α produz um efeito anti-dipsogênico em animais privados de água (Calapai *et al.*, 1992; De Castro *et al.*, 2006). Portanto, a redução na ingestão diária de água observada em ratos alimentados com DH poderia estar relacionada ao efeito inibitório das citocinas que atuam no SNC, sejam porque estão com os níveis aumentados devido à obesidade/ingestão de DH e/ou pela maior atividade do SRA, que também aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias.

Podemos também supor que durante a obesidade, um maior ganho de água metabólica através da oxidação lipídios poderia explicar a redução na ingestão de água em animais obesos. Estudos em outra espécie de roedor como o *Notomys alexis*, demonstraram mecanismos utilizados por eles no aumento do ganho de água quando expostos a deficiência prolongada de água. Além do aumento na ingestão de alimentos para que se forneçam mais substratos para a oxidação, esses animais consomem rapidamente a gordura previamente acumulada no início da privação hídrica levando a obtenção de água metabólica. Estes resultados sugerem um aumento na habilidade em aumentar a produção de água servindo como modelo de estudo para a obesidade pela alteração do apetite e mudanças metabólicas (Takei *et al.*, 2012).

Demonstramos também que ratos alimentados com DH tem ao longo das semanas, redução da ingestão alimentar. Foi demonstrado que o consumo de DH reduz a taxa do esvaziamento gástrico, provavelmente decorrente da maior secreção do hormônio colecistocinina (Li *et al.*, 2011), uma vez que esse hormônio reduz a taxa de esvaziamento gástrico (Covasa e Ritter, 2000; Covasa *et al.*, 2001). Além disso, a ANG II, que provavelmente está aumentada nos ratos DH, pode levar a uma excitação simpática ou até mesmo atuar na

musculatura lisa do estômago estimulando uma maior contração da região antro-pilórica fazendo com que ocorra a diminuição do esvaziamento gástrico (Garg *et al.*, 2012). Outros dados mostram que fornecimento da mesma comida durante um longo período de tempo pode levar à habituação, causando uma diminuição na ingestão de energia (Groves e Thompson, 1970; Temple *et al.*, 2008). Assim, a exposição da DH por um tempo prolongado poderia estar causando uma diminuição na ingestão de energia por esses animais.

Tem sido demonstrado que a obesidade induz uma diminuição na excreção de sódio e esta retenção de sódio o que parece contribuir para o aumento da PAM durante a obesidade (Bickel *et al.*, 2001; De Paula *et al.*, 2004; Nizar *et al.*, 2016). Cães alimentados por 5 semanas com uma DH têm uma diminuição na excreção de sódio, possivelmente decorrente dos maiores níveis de aldosterona encontrados (De Paula *et al.*, 2004). Por outro lado camundongos alimentados com dieta DH (Nizar *et al.*, 2016) ou ratos Zucker obesos (Bickel *et al.*, 2001), tiveram uma excreção de sódio urinária diária equivalente a camundongos alimentados com DP ou ratos Zucker magros, respectivamente, mas quando desafiados a uma dieta rica em sódio, tiveram dificuldades em excretar o excesso de sódio. Nesses experimentos com ratos Zucker ou camundongos, a maior expressão de transportadores de sódio no néfron induzidos pela insulina são sugeridos como o mecanismo responsável pela maior reabsorção de sódio. Em nosso trabalho, não observamos alteração na excreção de sódio, porém não testamos estes animais sob uma dieta rica em sódio, o que nos permitiria entender melhor a homeostase do sódio em ratos alimentados com DH. Por fim, o menor volume urinário provavelmente é devido a uma menor ingestão concomitante de água, e o menor volume urinário, deve ter levado, por menos arrasto, a uma menor excreção de potássio, mesmo que a concentração sérica de K^+ seja equivalente nos dois grupos.

7. CONCLUSÃO

Os presentes dados demonstraram a participação do SRA na alteração de parâmetros cardiovasculares, além de alterações no equilíbrio hidro-eletrolítico induzidas pela DH. Estes resultados mostram que os ratos DH têm uma resposta pressora potencializada à ANG II central sem alterar a resposta dipsogênica da ANG II e os receptores AT1 prosencefálicos parecem estar envolvidos na hipertensão induzida pela obesidade. Finalmente, ratos DH apresentaram uma redução no consumo diário de água, por mecanismos ainda a esclarecer, e a redução no volume urinário parece estar relacionado a isso.

8. REFERÊNCIAS

(NCD-RISC)*, N. R. F. C. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 198 million participants. **The Lancet**, v. 387, n. 10026, p. 1377-1396, 2016. ISSN 0140-6736. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30054-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30054-X) >.

AGHAMOHAMMADZADEH, R.; HEAGERTY, A. M. Obesity-related hypertension: Epidemiology, pathophysiology, treatments, and the contribution of perivascular adipose tissue. **Annals of Medicine**, v. 44, n. S1, p. S74-S84, 6/1/2012. ISSN 0785-3890. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3109/07853890.2012.663928> >.

ARNOLD, A. C. et al. Leptin impairs cardiovagal baroreflex function at the level of the solitary tract nucleus. **Hypertension**, v. 54, n. 5, p. 1001-1008, 11/2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19770402> >.

ASGHAR, A.; SHEIKH, N. Role of immune cells in obesity induced low grade inflammation and insulin resistance. **Cellular Immunology**, v. 315, p. 18-26, 2017/05/01/ 2017. ISSN 0008-8749. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008874917300345> >.

BAHIA, L. R.; ARAÚJO, D. V. Impacto econômico da obesidade no Brasil. **Revista HUPE**, v. 13, n. 1, p. 13-17, 2014. Disponível em: < doi:10.12957/rhupe.2014.9793 >.

BICKEL, C. A. et al. Increased renal Na-K-ATPase, NCC, and beta-ENaC abundance in obese Zucker rats. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 281, n. 4, p. F639-48, Oct 2001. ISSN 1931-857X (Print)

1522-1466 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11553510> >.

BLANCH, G. T. et al. Increased Expression of Angiotensin II Type 2 Receptors in the Solitary-Vagal Complex Blunts Renovascular Hypertension. **Hypertension**, v. 64, n. 4, p. 777-783, 6/23/2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24958505> >.

BONORA, E. et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J.Clin.Endocrinol.Metab**, v. 68, n. 2, p. 374-378, 2/1989. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2645308> >.

BOUSTANY, C. M. et al. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. **Am.J Physiol Regul.Integr.Comp Physiol**, v. 287, n. 4, p. R943-R949, 10/2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15191907> >.

BOUSTANY, C. M. et al. AT1-receptor antagonism reverses the blood pressure elevation associated with diet-induced obesity. **Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol**, v. 289, n. 1, p. R181-R186, 7/2005 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15774768> >.

CALAPAI, G. et al. Cloricromene antagonizes antidipsogenic effects induced by endotoxin, but not by TNF alpha, in the rat. **Life Sci**, v. 51, n. 26, p. 2041-8, 1992. ISSN 0024-3205 (Print) 0024-3205 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1474860> >.

CHEN, A. D. et al. Angiotensin AT1 receptors in paraventricular nucleus contribute to sympathetic activation and enhanced cardiac sympathetic afferent reflex in renovascular hypertensive rats. **Exp.Physiol**, v. 96, n. 2, p. 94-103, 2/2011 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21097645> >.

CINTI, S. The adipose organ. **Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids**, v. 73, n. 1, p. 9-15, 7/2005 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15936182> >.

COVASA, M.; MARCUSON, J. K.; RITTER, R. C. Diminished satiation in rats exposed to elevated levels of endogenous or exogenous cholecystokinin. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 280, n. 2, p. R331-7, Feb 2001. ISSN 0363-6119 (Print) 0363-6119 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11208559> >.

COVASA, M.; RITTER, R. C. Adaptation to high-fat diet reduces inhibition of gastric emptying by CCK and intestinal oleate. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 278, n. 1, p. R166-70, Jan 2000. ISSN 0363-6119 (Print) 0363-6119 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10644635> >.

DE CASTRO, E. S. E. et al. Role of the central opioid system in the inhibition of water and salt intake induced by central administration of IL-1beta in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 83, n. 2, p. 285-95, Feb 2006. ISSN 0091-3057 (Print) 0091-3057 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16554088> >.

DE GASPARO, M. et al. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. **Pharmacol.Rev.**, v. 52, n. 3, p. 415-472, 9/2000 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10977869> >.

DE KLOET, A. D. et al. Obesity induces neuroinflammation mediated by altered expression of the renin-angiotensin system in mouse forebrain nuclei. **Physiol Behav.**, v. 136, p. 31-38, 2/6/2014 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24508821> >.

DE LUCA, L. A., JR. et al. Participation of alpha2 -adrenoceptors in sodium appetite inhibition during sickness behaviour following administration of lipopolysaccharide. **J Physiol**, v. 594, n. 6, p. 1607-16, Mar 15 2016. ISSN 1469-7793 (Electronic)

0022-3751 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26036817> >.

DE LUCA, L. A., JR. et al. Effects of intracerebroventricular injections of losartan or PD123319 on arterial pressure and heart rate of sodium replete and sodium deplete rats. **Regul Pept**, v. 66, n. 1-2, p. 31-5, Oct 8 1996. ISSN 0167-0115 (Print)

0167-0115 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8899889> >.

DE PAULA, R. B.; DA SILVA, A. A.; HALL, J. E. Aldosterone antagonism attenuates obesity-induced hypertension and glomerular hyperfiltration. **Hypertension**, v. 43, n. 1, p. 41-7, Jan 2004. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14638627> >.

DE SOUZA, C. T. et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology**, v. 146, n. 10, p. 4192-4199, 10/2005 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16002529> >.

DELBIN, M. A. et al. Interaction between advanced glycation end products formation and vascular responses in femoral and coronary arteries from exercised diabetic rats. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e53318, 2012 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23285277> >.

DESPRES, J. P.; LEMIEUX, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 881-887, 12/14/2006 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17167477> >.

DORRESTEIJN, J. A.; VISSEREN, F. L.; SPIERING, W. Mechanisms linking obesity to hypertension. **Obes Rev**, v. 13, n. 1, p. 17-26, Jan 2012. ISSN 1467-789X (Electronic)

1467-7881 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21831233> >.

EPSTEIN, A. N.; FITZSIMONS, J. T.; ROLLS, B. J. Drinking induced by injection of angiotensin into the brain of the rat. **J.Physiol.**, v. 210, p. 457-474, 1970 1970.

EPSTEIN, A. N. et al. Exaggerated Prandial Drinking in the Rat without Salivary Glands. **Nature**, v. 201, p. 1342-3, Mar 28 1964. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14151436> >.

ERDOS, B. et al. Effect of age on high-fat diet-induced hypertension. **Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol**, v. 301, n. 1, p. H164-H172, 7/2011 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21551274> >.

EVERED, M. D. Investigating the role of angiotensin II in thirst: interactions between arterial pressure and the control of drinking. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 70, n. 5, p. 791-7, May 1992. ISSN 0008-4212 (Print)

0008-4212 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1423023> >.

FARDIN, N. M.; OYAMA, L. M.; CAMPOS, R. R. Changes in baroreflex control of renal sympathetic nerve activity in high-fat-fed rats as a predictor of hypertension. **Obesity.(Silver.Spring)**, v. 20, n. 8, p. 1591-1597, 8/2012 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22257982> >.

FINUCANE, M. M. et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. **Lancet**, v. 377, n. 9765, p. 557-567, 2/12/2011 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21295846> >.

GARG, M. et al. Review article: the pathophysiological roles of the renin-angiotensin system in the gastrointestinal tract. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 35, n. 4, p. 414-28, Feb 2012. ISSN 1365-2036 (Electronic)

0269-2813 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22221317> >.

GROVES, P. M.; THOMPSON, R. F. Habituation: a dual-process theory. **Psychol Rev**, v. 77, n. 5, p. 419-50, Sep 1970. ISSN 0033-295X (Print)

0033-295X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4319167> >.

GUILLEMOT-LEGRIS, O. et al. High-fat diet feeding differentially affects the development of inflammation in the central nervous system. **J Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 206, Aug 26 2016. ISSN 1742-2094 (Electronic)

1742-2094 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27566530> >.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nat.Rev Neurosci**, v. 7, n. 5, p. 335-346, 5/2006 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16760914> >.

HALL, J. E. The kidney, hypertension, and obesity. **Hypertension**, v. 41, n. 3 Pt 2, p. 625-33, Mar 2003. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12623970> >.

HALL, J. E. et al. Obesity-induced hypertension: role of sympathetic nervous system, leptin, and melanocortins. **J Biol.Chem.**, v. 285, n. 23, p. 17271-17276, 6/4/2010 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20348094> >.

HALL, J. E. et al. Obesity-induced hypertension: interaction of neurohumoral and renal mechanisms. **Circ Res**, v. 116, n. 6, p. 991-1006, Mar 13 2015. ISSN 1524-4571 (Electronic) 0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25767285> >.

HENEGAR, J. R. et al. Functional and structural changes in the kidney in the early stages of obesity. **J Am Soc Nephrol**, v. 12, n. 6, p. 1211-7, Jun 2001. ISSN 1046-6673 (Print) 1046-6673 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11373344> >.

HILZENDEGER, A. M. et al. A brain leptin-renin angiotensin system interaction in the regulation of sympathetic nerve activity. **Am.J Physiol Heart Circ.Physiol**, v. 303, n. 2, p. H197-H206, 7/15/2012 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22610169> >.

HOFFMAN, W. E. et al. Antidiuretic hormone release and the pressor response to central angiotensin II and cholinergic stimulation. **Neuropharmacology**, v. 16, p. 463-472, 1977 1977.

KARLSSON, C. et al. Human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensin II. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 83, n. 11, p. 3925-9, Nov 1998. ISSN 0021-972X (Print) 0021-972X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9814470> >.

KASCHINA, E.; UNGER, T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. **Blood Press**, v. 12, n. 2, p. 70-88, 2003 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12797627> >.

KROGH-MADSEN, R. et al. Normal physical activity obliterates the deleterious effects of a high-caloric intake. **J Appl.Physiol (1985.)**, v. 116, n. 3, p. 231-239, 2/1/2014 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24201706> >.

KURTZ, T. W.; MORRIS, R. C.; PERSHADSINGH, H. A. The Zucker fatty rat as a genetic model of obesity and hypertension. **Hypertension**, v. 13, n. 6 Pt 2, p. 896-901, Jun 1989. ISSN 0194-911X (Print) 0194-911X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2786848> >.

LI, J.; MA, W.; WANG, S. Slower gastric emptying in high-fat diet induced obese rats is associated with attenuated plasma ghrelin and elevated plasma leptin and cholecystokinin concentrations. **Regulatory Peptides**, v. 171, n. 1, p. 53-57, 2011/11/10/ 2011. ISSN 0167-0115. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167011511001352> >.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 12/2001 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609> >.

MANCIA, G. et al. The sympathetic nervous system and the metabolic syndrome. **J.Hypertens.**, v. 25, n. 5, p. 909-920, 5/2007 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17414649> >.

MARCUS, Y.; SHEFER, G.; STERN, N. Adipose tissue renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and progression of insulin resistance. **Mol Cell Endocrinol**, v. 378, n. 1-2, p. 1-14, Sep 25 2013. ISSN 1872-8057 (Electronic)

0303-7207 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22750719> >.

MARK, A. L. et al. Leptin signaling in the nucleus tractus solitarii increases sympathetic nerve activity to the kidney. **Hypertension**, v. 53, n. 2, p. 375-380, 2/2009 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19103999> >.

MAURO, C. et al. Metabolic syndrome and the immunological affair with the blood-brain barrier. **Front Immunol**, v. 5, p. 677, 2014. ISSN 1664-3224 (Electronic)

1664-3224 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25601869> >.

MAYER, M. A. et al. Central insulin-angiotensin II interaction in blood pressure regulation in fructose overloaded rats. **Regul Pept**, v. 185, p. 37-43, Aug 10 2013. ISSN 1873-1686 (Electronic)

0167-0115 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23816464> >.

MCKINLEY, M. J.; JOHNSON, A. K. The Physiological Regulation of Thirst and Fluid Intake. **News Physiol.Sci.**, v. 19, n. 1, p. 1-6, 2/1/2004 2004. Disponível em: < <http://nips.physiology.org/cgi/content/abstract/19/1/1> >.

MCKINLEY, M. J. et al. Physiological actions of angiotensin II mediated by AT1 and AT2 receptors in the brain. **Clin.Exp.Pharmacol.Physiol Suppl**, v. 3, p. S99-104, 1996 1996. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8993847> >.

MOKDAD, A. H. et al. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. **JAMA**, v. 289, n. 1, p. 76-79, 1/1/2003 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12503980> >.

MUNTZEL, M. S. et al. Intracerebroventricular insulin produces nonuniform regional increases in sympathetic nerve activity. **Am J Physiol**, v. 267, n. 5 Pt 2, p. R1350-5, Nov 1994. ISSN 0002-9513 (Print)

0002-9513 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7977864> >.

NIZAR, J. M. et al. Na⁺-sensitive elevation in blood pressure is ENaC independent in diet-induced obesity and insulin resistance. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 310, n. 9, p. F812-20, May 1 2016. ISSN 1522-1466 (Electronic)

1522-1466 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26841823> >.

OMOUESSI, S. T. et al. DOCA stimulates salt appetite in Zucker rats: effect of dose, synergistic action with central angiotensin II, and obesity. **Brain Res Bull**, v. 74, n. 1-3, p. 14-20, Sep 14 2007. ISSN 0361-9230 (Print)

0361-9230 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17683784> >.

RAMALHO, A. F. et al. Dietary fats promote functional and structural changes in the median eminence blood/spinal fluid interface-the protective role for BDNF. **J Neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 10, Jan 9 2018. ISSN 1742-2094 (Electronic)

1742-2094 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29316939> >.

RONCARI, C. F. et al. Enhanced angiotensin II induced sodium appetite in renovascular hypertensive rats. **Peptides**, v. 101, p. 82-88, 2018/03/01/ 2018. ISSN 0196-9781. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978117304035> >.

ROSINGER, A. Y. et al. The role of obesity in the relation between total water intake and urine osmolality in US adults, 2009-2012. **Am J Clin Nutr**, v. 104, n. 6, p. 1554-1561, Dec 2016. ISSN 1938-3207 (Electronic)

0002-9165 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27935519> >.

RUCHAYA, P. J. et al. Overexpression of AT2R in the solitary-vagal complex improves baroreflex in the spontaneously hypertensive rat. **Neuropeptides**, v. 60, p. 29-36, 12// 2016. ISSN 0143-4179. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143417916300166> >.

SCHLAICH, M. P. et al. European Society of Hypertension Working Group on Obesity Obesity-induced hypertension and target organ damage: current knowledge and future directions. **J.Hypertens.**, v. 27, n. 2, p. 207-211, 2/2009 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19155773> >.

SPERETTA, G. F. et al. High-fat diet increases respiratory frequency and abdominal expiratory motor activity during hypercapnia. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 258, p. 32-39, Oct 9 2018. ISSN 1878-1519 (Electronic)

1569-9048 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30308245> >.

SPERETTA, G. F. et al. The effects of exercise modalities on adiposity in obese rats. **Clinics.(Sao Paulo)**, v. 67, n. 12, p. 1469-1477, 12/2012 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23295603> >.

SPERETTA, G. F. et al. Importance of AT1 and AT2 receptors in the nucleus of the solitary tract in cardiovascular responses induced by a high-fat diet. **Hypertension Research**, 2019/01/10 2019. ISSN 1348-4214. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/s41440-018-0196-0> >.

SPERETTA, G. F. et al. Resistance training prevents the cardiovascular changes caused by high-fat diet. **Life Sci.**, v. 146, p. 154-162, 2/1/2016 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26776833> >.

SRIRAMULA, S.; CARDINALE, J. P.; FRANCIS, J. Inhibition of TNF in the brain reverses alterations in RAS components and attenuates angiotensin II-induced hypertension. **PLoS.One.**, v. 8, n. 5, p. e63847, 2013 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23691105> >.

STOCKER, S. D.; MEADOR, R.; ADAMS, J. M. Neurons of the rostral ventrolateral medulla contribute to obesity-induced hypertension in rats. **Hypertension**, v. 49, n. 3, p. 640-646, 3/2007 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17190873> >.

SUGERMAN, H. et al. Intra-abdominal pressure, sagittal abdominal diameter and obesity comorbidity. **J Intern Med**, v. 241, n. 1, p. 71-9, Jan 1997. ISSN 0954-6820 (Print)

0954-6820 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9042096> >.

SUMNERS, C. et al. Angiotensin type 2 receptors: blood pressure regulation and end organ damage. **Curr.Opin.Pharmacol.**, v. 21C, p. 115-121, 2/9/2015 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25677800> >.

TAKEI, Y. et al. Water deprivation induces appetite and alters metabolic strategy in *Notomys alexis*: unique mechanisms for water production in the desert. **Proc Biol Sci**, v. 279, n. 1738, p. 2599-608, Jul 7 2012. ISSN 1471-2954 (Electronic)

0962-8452 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22398167> >.

TEITELBAUM, P.; EPSTEIN, A. N. The lateral hypothalamic syndrome: recovery of feeding and drinking after lateral hypothalamic lesions. **Psychol Rev**, v. 69, p. 74-90, Mar 1962. ISSN 0033-295X (Print)

0033-295X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13920110> >.

TEMPLE, J. L. et al. Dietary variety impairs habituation in children. **Health Psychol**, v. 27, n. 1S, p. S10-9, Jan 2008. ISSN 1930-7810 (Electronic)

0278-6133 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18248101> >.

THALER, J. P. et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. **J Clin. Invest**, v. 122, n. 1, p. 153-162, 1/3/2012 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22201683> >.

THORNTON, S. N. Increased Hydration Can Be Associated with Weight Loss. **Front Nutr**, v. 3, p. 18, 2016. ISSN 2296-861X (Print)

2296-861X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27376070> >.

TIMPSON, N. J. et al. Does greater adiposity increase blood pressure and hypertension risk?: Mendelian randomization using the FTO/MC4R genotype. **Hypertension**, v. 54, n. 1, p. 84-90, 7/2009 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19470880> >.

URZEDO-RODRIGUES, L. S. et al. Hypothalamic disconnection caudal to paraventricular nucleus affects cardiovascular and drinking responses to central angiotensin II and carbachol. **Brain Res.**, v. 1388, p. 100-108, 5/4/2011 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21406187> >.

VIGITEL. **Vigitel Brasil 2017 Saúde Suplementar : vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. Brasília: Ministério da Saúde: 142 p. 2017.

VILLELA, D. et al. Angiotensin type 2 receptor (AT2R) and receptor Mas: a complex liaison. **Clin.Sci.(Lond)**, v. 128, n. 4, p. 227-234, 2/1/2015 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25328009> >.

WHO. 2016. Disponível em: < <http://www.who.int/topics/obesity/en/> >.

XUE, B. et al. Central Renin-Angiotensin System Activation and Inflammation Induced by High-Fat Diet Sensitize Angiotensin II-Elicited Hypertension. **Hypertension**, v. 67, n. 1, p. 163-70, Jan 2016. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26573717> >.

YIANNIKOURIS, F. et al. Adipocyte deficiency of angiotensinogen prevents obesity-induced hypertension in male mice. **Hypertension**, v. 60, n. 6, p. 1524-30, Dec 2012. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23108647> >.

YIANNIKOURIS, F. et al. Adipocyte-specific deficiency of angiotensinogen decreases plasma angiotensinogen concentration and systolic blood pressure in mice. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 302, n. 2, p. R244-51, Jan 15 2012. ISSN 1522-1490 (Electronic)

0363-6119 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22071160> >.

ZOCAL, D. B. et al. The nucleus of the solitary tract and the coordination of respiratory and sympathetic activities. **Frontiers in Physiology**, v. 5, n. 238, 2014-June-25 2014. ISSN 1664-042X. Disponível em: < <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2014.00238> >.