

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS

Thales de Almeida Pinheiro

Avaliação metabólica e dos componentes do Sistema Renina-Angiotensina e
Atividade Inflamatória em Camundongos submetidos à Restrição Alimentar

Montes Claros
2015

Thales de Almeida Pinheiro

Avaliação metabólica e dos componentes do Sistema Renina-Angiotensina e Atividade Inflamatória em Camundongos submetidos à Restrição Alimentar

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências em Saúde da Universidade Estadual de Montes Claros-Unimontes, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Mecanismos e Aspectos Clínicos das Doenças

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Henrique Sousa Santos

Montes Claros - MG

2015

P654a

Pinheiro, Thales de Almeida.

Avaliação metabólica e dos componentes do Sistema Renina-Angiotensina e atividade inflamatória em camundongos submetidos à restrição alimentar [manuscrito] / Thales de Almeida Pinheiro. – 2015.

68 f. : il.

Bibliografia: f. 60 - 67.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde/PPGCS, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Henrique Sousa Santos.

1. Metabolismo – Distúrbios da nutrição. 2. Restrição alimentar. 3. Citocinas. 4. Sistema Renina-Angiotensina. I. Santos, Sérgio Henrique Sousa. II. Universidade Estadual de Montes Claros. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS-UNIMONTES

Reitor(a): João dos Reis Canela

Vice-reitor(a): Antônio Alvimar Souza

Pró-reitor(a) de Pesquisa: Rômulo Soares Barbosa

Coordenadoria de Acompanhamento de Projetos: Karen Torres Correa Lafetá de Almeida

Coordenadoria de Iniciação Científica: Afrânio Farias de Melo

Coordenadoria de Inovação Tecnológica: Dario Alves de Oliveira

Pró-reitor(a) de Pós-graduação: Hercílio Martelli Júnior

Coordenadoria de Pós-graduação Stricto-sensu: Ildenílson Meireles Barbosa

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Coordenador(a): André Luiz Sena Guimarães

Subcoordenador(a): Lucyana Conceição Faria e Desirée Sant'Ana Haikal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



MESTRANDA: THALES DE ALMEIDA PINHEIRO

TÍTULO DO TRABALHO: "Avaliação metabólica e dos componentes do Sistema Renina-Angiotensina e Atividade Inflamatória em Camundongos submetidos à Restrição Calórica".

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Mecanismos e Aspectos Clínicos das Doenças

LINHA DE PESQUISA: Etiopatogenia e Fisiopatologia das Doenças

BANCA (TITULARES)

PROF. DR. - SÉRGIO HENRIQUE SOUSA SANTOS, ORIENTADOR/PRESIDENTE

PROF^ª. DR^ª. KÁTIA DE ANGELIS


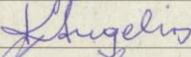

PROF. DR. ANDRÉ LUIZ SENA GUIMARÃES

BANCA (SUPLENTES)

PROF^ª. DR^ª. LUCYANA CONCEIÇÃO FARIAS

PROF. DR. SÉRGIO AVELINO MOTA NOBRE

ASSINATURAS

ASSINATURAS

APROVADA

REPROVADA

Hospital Universitário Clemente Farias – HUCF

<http://www.unimontes.br> / ppgcs@unimontes.br

Telefone: (0xx38) 3224-8372 / Fax: (0xx38) 3224-8372

Av. Cula Mangabeira, 562, Santo Expedito, Montes Claros – MG, Brasil – Cep: 39401-001

Dedico esta conquista aos meus pais Geraldo Raimundo Pinheiro e Ivone de Almeida Pinheiro, os principais protagonistas de toda a minha história, e a minha esposa Ivana David Maia Pinheiro.

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, provedor de todas as bênçãos e graças recebidas em minha vida. Àquele que reserva a verdadeira sabedoria aos retos, a inteligência aos justos e o entendimento aos puros de coração. Obrigado pela presença constante em minha vida!

Aos meus pais, *Geraldo Raimundo Pinheiro* e *Ivone de Almeida Pinheiro*, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade. Obrigado por abrirem mãos dos seus sonhos para realização dos meus e dos meus irmãos. Amo Vocês!

A minha esposa e eterna alma gêmea *Ivana David Maia Pinheiro*. Obrigado por me apoiar e compreender a minha ausência durante a execução desse trabalho.

Aos meus queridos irmãos *Mardem, Thaisa e Marla*. Obrigado pelo amor e amizade. A Thaisa, um agradecimento em especial. Obrigado pelas horas de dedicação durante o tratamento dos animais no biotério e durante a execução das técnicas moleculares. Aprendi a te admirar ainda mais durante esse período.

Aos meus *familiares, tios, tias, primos, primas, afilhado* que permaneceram na torcida, orando pela concretização do trabalho e que mesmo distantes sempre estiveram presentes. Obrigada pelo apoio e compreensão. E dividam comigo mais esta conquista, porque o mérito também pertence a vocês.

Ao meu professor orientador, *Sérgio*, pelo qual tenho profunda admiração e respeito. Agradeço pela dedicação e competência. Referência de orientador a ser seguido e idealizado. Sempre serei grato à oportunidade recebida.

Às *Faculdades Integradas Pitágoras do Norte de Minas – FIP/MOC*, referência de Instituição de Ensino a ser seguida. Obrigado pela confiança e apoio durante a execução desse projeto. Em especial ao Professor Antônio Prates Caldeira, pela oportunidade e confiança, Lucílio Alkmin e Bruno, que sempre se mostraram disponíveis para ajudar, e ao aluno de iniciação científica Emílio César, que não mediu esforços para o bom andamento desse projeto.

Aos *amigos do Laboratório de Pesquisa em Saúde* pelo aprendizado diário e permanente. Apesar de pouco contato com alguns, foi um prazer estar com todos vocês.

Em especial ao *João Marcus* e a *Alanna*, pelo trabalho em conjunto, experiências compartilhadas, aprendizado diário e permanente. Seria eternamente grato a vocês!

Ao *colegiado do PPGCS*. Obrigado pela oportunidade que me foi concedida.

Aos meus *amigos*, pelo apoio, incentivo e amizade mantida.

RESUMO

O aumento da prevalência da obesidade em todo o mundo apresenta grande impacto na saúde pública uma vez que o acúmulo excessivo de gordura corporal no indivíduo é considerado fator de risco para doenças cardiovasculares e é uma das principais características da síndrome metabólica (SM). Estudos experimentais sugerem que o sistema renina-angiotensina (SRA) em tecido adiposo é influenciado pelo grau de obesidade e que a restrição alimentar em roedores impede ou retarda a ocorrência de várias doenças crônicas. O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil metabólico, os componentes do sistema renina-angiotensina e atividade inflamatória no tecido adiposo epididimal de camundongos submetidos à restrição alimentar. Camundongos Swiss machos foram divididos em oito grupos e foram alimentados durante oito semanas com: G1: Dieta Padrão (ST) *ad libitum*; G2: ST-20% restrição alimentar; G3: ST-40% restrição alimentar; G4: ST-60% restrição alimentar; G5: Dieta rica em gordura (HFD) *ad libitum*; G6: HFD-20% restrição alimentar; G7: HFD-40% restrição alimentar; G8: HFD-60% restrição alimentar. Foram avaliados o consumo alimentar, peso corporal, parâmetros glicêmicos, perfil lipídico e albumina. O peso dos tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e mesentérico e a área de adipócitos do tecido adiposo epididimal foram analisados. A expressão de AGT, ECA, ECA-2, IL-6 e TNF- α do tecido adiposo epididimal foi avaliada por PCR em tempo real. Os principais resultados mostraram uma redução do peso corporal, melhora da glicemia e do perfil lipídico, redução da albumina, diminuição do peso dos tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e mesentérico e redução da área dos adipócitos no tecido adiposo epididimal de camundongos submetidos à restrição alimentar sobre dietas normolipídica e hiperlipídica. A diminuição da expressão de IL-6, TNF- α , AGT e ECA foi detectada nos grupos de tratamento de 20% e 40%, e um aumento da expressão nos grupos de restrição alimentar de 60%. Em conclusão, observou-se que restrição alimentar de 20% e 40% melhora o metabolismo, controla a expressão do SRA e de citocinas inflamatórias em camundongos, enquanto que uma severa restrição alimentar de 60% (desnutrição) produz um novo perfil pró-inflamatório com aumento das expressões de AGT e ECA.

Palavras-chave: Metabolismo. Distúrbios da nutrição. Restrição alimentar. Citocinas. Sistema renina angiotensina.

ABSTRACT

The increasing prevalence of obesity worldwide has a great impact on public health as the excessive accumulation of body fat is considered a risk factor for cardiovascular disease, and it is one of the main features of the metabolic syndrome (MS). Experimental studies suggest that renin-angiotensin system (RAS) in adipose tissue is influenced by the obesity degree and food restriction in rodents prevents or delays the occurrence of various chronic diseases. The purpose of this study was to evaluate the metabolic profile, the components of the renin-angiotensin system and inflammatory activity in epididymal adipose tissue of mice subjected to food restriction. Male Swiss mice were divided into eight groups and were fed for eight weeks with: G1: Standard Diet (ST) *ad libitum*; G2: ST-20% food restriction; G3: ST-40% food restriction; G4: ST-60% food restriction; G5: High-Fat Diet (HFD) *ad libitum*; G6: HFD-20% food restriction; G7: HFD-40% food restriction; G8: HFD-60% food restriction. Food intake, body weight, glycemic parameters, lipid profile and albumin were assessed. The weight of epididymal, retroperitoneal, and mesenteric adipose tissues and the area of adipocytes from epididymal adipose tissue were analyzed. The expression of AGT, ACE, ACE-2, IL-6 and TNF- α in epididymal adipose tissue was evaluated by real-time PCR. The main findings showed a reduced body weight, improved glycemic and lipid profile, reduced albumin, decreased weights of the epididymal, mesenteric and retroperitoneal adipose tissues and reduced adipocyte size in epididymal adipose tissue of mice submitted to food restriction under standard or high-fat diet. A diminished expression of IL-6, TNF- α , AGT and ACE was detected in the 20% and 40% treatment groups, and increased expression in the 60% caloric restriction groups. In conclusion, we observed that 20% and 40% caloric restriction improved metabolism, controlling the RAS and cytokine expression in mice, while a severe 60% caloric restriction (malnutrition) produced a new pro-inflammatory profile with increased AGT and ACE expression.

Keywords: Metabolism. Nutrition disorders. Food restriction. Cytokines. Renin-angiotensin system.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acetil CoA carboxilase
AGT	Angiotensinogênio
ANG II	Angiotensina-II
Ang-(1-7)	Angiotensina 1-7
AT1	Receptor de angiotensina tipo AT1
AT2	Receptor de angiotensina tipo AT2
CCL2	Quimiocina ligante de CC2
CXCL5	Quimiocina CXCL5
DM	Diabetes mellitus
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECA2	Enzima conversora de angiotensina-2
ERO	Espécies reativas de oxigênio (ERO)
ET-1	Endotelina tipo 1
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IL-18	Interleucina-18
IL-6	Interleucina-6
LDL-C	Lipoproteína de baixa densidade
Mas	Receptor de Angiotensina 1-7
mRNA	RNA mensageiro
NEP	Neutral-endopeptidase
NF- kB	Fator nucear - kB
NO	Óido nítrico (NO)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCP	Prolil-carboxipeptidase
PEP	Prolil-endopeptidase
PGI2	Prostaglandinas PGI2
SD	Sprague-Dawley
SM	Síndrome Metabólica
SNS	Sistema nervoso simpático
SRA	Sistema renina-angiotensina

TAB	Tecido adiposo branco
TNF- α	Factor de necrose tumoral- α
VCAM-1	Molécula de adesão da célula vascular
VIGITEL	Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por Inquérito Telefônico
VLDL-C	Lipoprotéicas de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Obesidade e Síndrome Metabólica	12
1.2 Restrição Alimentar e Desnutrição	16
1.3 Manifestações inflamatórias associadas à obesidade e desnutrição.....	18
1.4 Sistema Renina-Angiotensina	20
1.5 Interação do Sistema Renina-Angiotensina e Metabolismo	24
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral	27
2.2 Objetivos Específicos	27
3 PRODUTOS	28
3.1 Artigo 1: OBESITY AND MALNUTRITION: SIMILARITY OF PRO- INFLAMMATORY STATES BY MODULATION OF THE RENIN- ANGIOTENSIN SYSTEM.....	29
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
REFERÊNCIAS	60
ANEXO	68
ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Experimentação e Bem Estar Animal ...	68

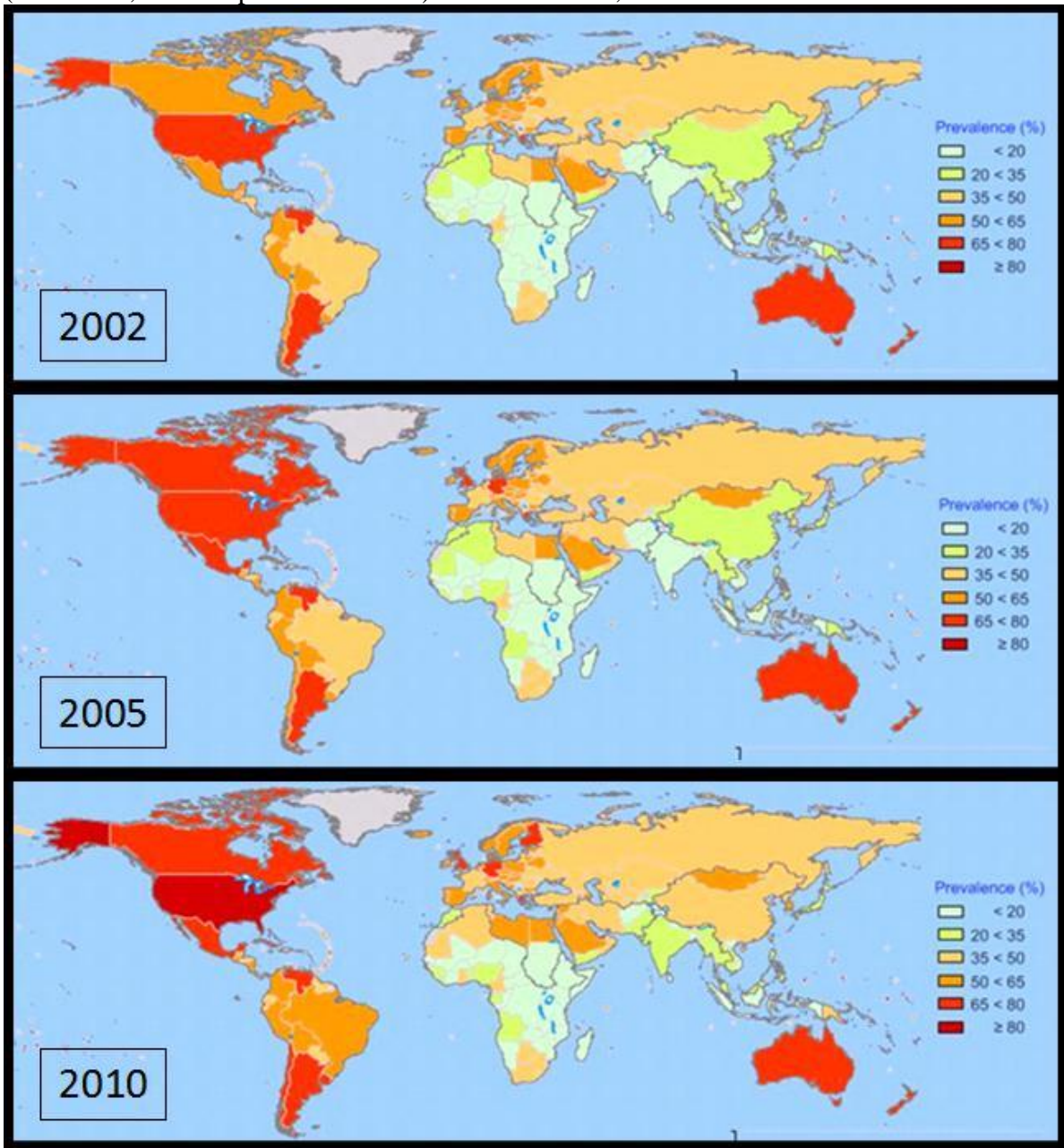
1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade e Síndrome Metabólica

As transformações ocorridas nos padrões socioeconômicos e culturais, nas últimas décadas, contribuíram de forma significativa para o aumento da expectativa de vida das pessoas, entretanto, esse novo padrão de vida, que exige hábitos alimentares pouco saudáveis, exposição diária a elevada carga de estresse e falta de tempo para a prática de atividade física, tem contribuído para o aumento da prevalência de doenças crônicas não-transmissíveis, como as doenças cardiovasculares, diversos tipos de câncer, diabetes e obesidade (1-4).

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal, resultante do desequilíbrio entre a ingestão e o gasto de energia (5, 6). A etiologia da obesidade é considerada multifatorial e está associada a fatores genéticos e ambientais (6-8). Em 2005 aproximadamente 1,5 bilhão de adultos apresentavam sobrepeso e, destes, mais de 200 milhões de homens e cerca de 300 milhões de mulheres eram obesos (9, 10). Em comparação com os dados de 1980, o aumento na prevalência de obesidade foi superior a duas vezes, e as projeções para os próximos anos estimam que, em 2030, um número próximo a 3,3 bilhões de pessoas, ou 57,8% da população adulta mundial, terá sobrepeso ou obesidade (11, 12). A Figura 01 descreve a prevalência estimada de excesso de peso baseado no índice de massa corporal ($IMC > 25 \text{ Kg/m}^2$) na população mundial masculina com idade superior a 15 anos de idade nos anos de 2002, 2005 e 2010 evidenciando de forma ilustrativa como a obesidade vem se tornando uma questão pandêmica (11).

Figura 01: Prevalência estimada de excesso de peso ($IMC \geq 25\text{kg/m}^2$) na população mundial (masculina, idade superior a 15 anos) no ano de 2002, 2005 e 2010.



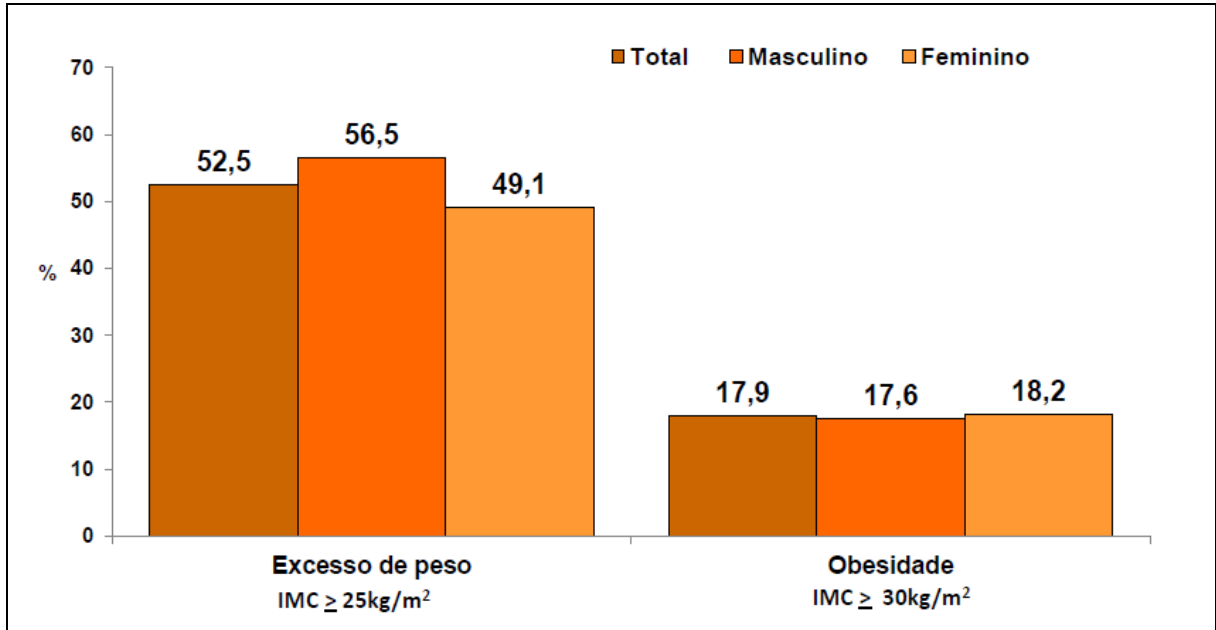
Fonte: Organização Mundial da Saúde (OMS), 2011.

Disponível em: <https://apps.who.int/infobase/Comparisons.aspx>. Acesso em 14 de julho de 2015.

No Brasil, desde 1974 observou-se aumento da prevalência de excesso de peso de quase três vezes em homens adultos e de quase duas vezes em mulheres adultas. No mesmo período, a prevalência de obesidade aumentou em mais de quatro vezes no sexo masculino e em mais de duas vezes no sexo feminino (12). Estudo de vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico (VIGITEL) realizado pelo Ministério da Saúde em

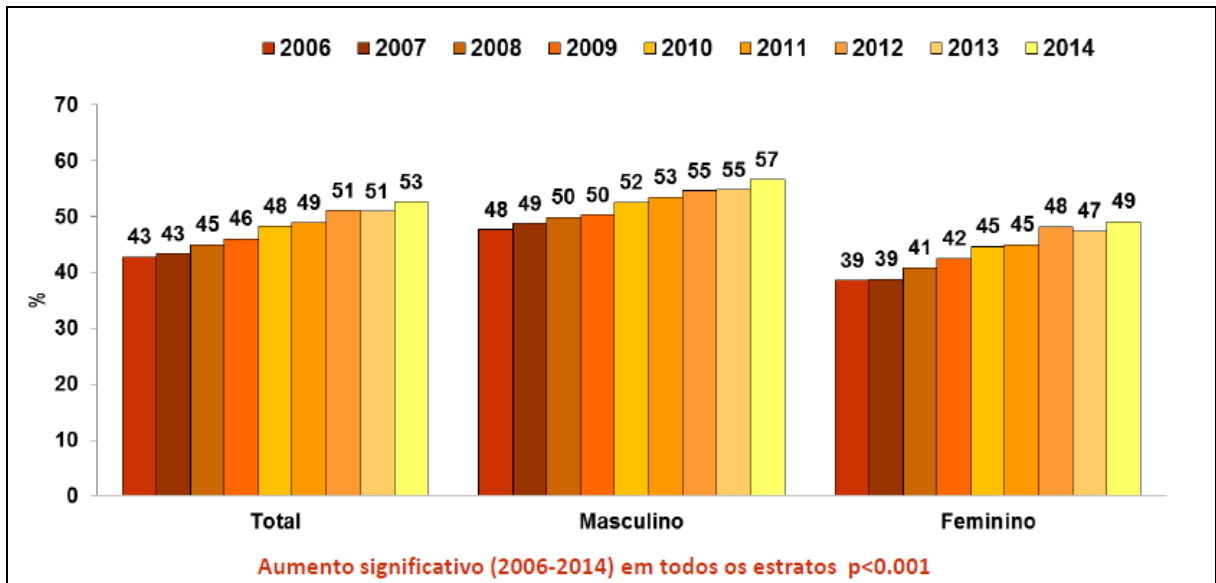
2014 descreveu que a população brasileira apresentava 52,5% de indivíduos acima do peso e 17,9% de obesos, como mostra a Figura 02 (13). Outro dado interessante evidenciado por esse mesmo estudo foi o aumento significativo de excesso de peso entre os anos de 2006 a 2014 (Figura 03).

Figura 02: Prevalência de excesso de peso e obesidade por sexo da população brasileira em 2014.



Fonte: VIGITEL, 2014. Acesso em 15 de julho de 2015.

Figura 03: Evolução da frequência do excesso de peso de 2006 a 2014 da população brasileira.



Fonte: VIGITEL, 2014. Acesso em 15 de julho de 2015.

A pandemia de obesidade na atualidade é um fator paralelo às crescentes taxas de prevalência de síndrome metabólica (SM) (14). Essa prevalência está aumentando em proporções epidêmicas, não só nos Estados Unidos e no restante do mundo urbanizado, mas também nas nações em desenvolvimento (15). A prevalência de SM na população em geral é aproximadamente 24% e superior a 80% entre os pacientes com diabetes *mellitus* (DM) tipo 2 (16, 17). Assim, evidencia-se a necessidade de novas investigações, bem como um aprofundamento da cooperação entre as organizações nacionais e internacionais sobre a questão (14).

A SM é caracterizada pela coexistência em graus variáveis de obesidade, hiperinsulinemia, dislipidemia e hipertensão arterial (18, 19). Também pode se manifestar associada a outras comorbidades, como estado pró-trombótico, o estado pró-inflamatório, a doença hepática gordurosa não alcoólica, distúrbios reprodutivos, microalbuminúria e distúrbios da coagulação sanguínea (20, 21). A SM apresenta causa multifatorial como a obesidade, sendo influenciada pela interação entre predisposição genética e fatores ambientais, como estilo de vida, hábitos alimentares e sedentarismo (2, 21).

As evidências disponíveis a partir de três períodos consecutivos de grandes meta-análises têm sistematicamente demonstrado que as pessoas com síndrome metabólica possuem um aumento para o risco de eventos cardiovasculares (22). A mais recente e maior delas incluiu cerca de um milhão de pacientes (total n=951083). Os investigadores concluíram que a síndrome metabólica está associada com um aumento de 2 vezes em desfechos cardiovasculares e um aumento de 1,5 vezes em todas as causas de mortalidade. Uma descoberta muito importante desse estudo foi a evidência de que o risco cardiovascular é alto em pacientes com a síndrome metabólica mesmo que não sejam portadores de diabetes (23). Dessa forma, a síndrome metabólica pode ser um colaborador adicional útil na estimativa do risco cardiovascular global, além de outros fatores de risco já conhecidos como idade e níveis elevados de LDL-C (22).

O conjunto de distúrbios metabólicos que caracteriza a SM foi descrito pela primeira vez na década de 1920 como uma alteração patológica associada à hipertensão, hiperglicemia e gota (24). Alguns décadas depois foi descrito que o excesso de gordura corporal estava relacionado com anormalidades metabólicas, como o DM tipo 2 e doenças cardiovasculares (25). Na década de 1980, Reaven introduziu o termo Síndrome X, considerando a resistência à

insulina, hipertensão arterial ou DM tipo 2, hiperinsulinemia e dislipidemia como critérios comuns a síndrome. Outras expressões foram empregadas em substituição a SM, como síndrome plurimetabólica, síndrome da resistência à insulina, quarteto mortal, dentre outras (26). Em 1998, a OMS propôs a denominação comum de Síndrome Metabólica para esse conjunto de alterações metabólicas (27, 28).

Considerando que SM está associada à obesidade e resistência a insulina, isso proporciona uma concepção útil para prevenção e tratamento da mesma, que pode ser traduzida de forma simplista pela mudança de estilo de vida, a qual deve incluir restrição calórica, perda de peso e aumento da atividade física (22).

1.2 Restrição Alimentar e Desnutrição

A maioria dos benefícios relacionados à restrição alimentar ou calórica está ligada à redução dos depósitos de gordura, em especial da visceral e, conseqüentemente, das substâncias por eles produzidas, sendo tal processo irrefutável por sua reprodutibilidade (1).

A restrição calórica é caracterizada por um regime dietético de baixo teor calórico sem que cause desnutrição e foi descrita pela primeira vez como preditora de longevidade em roedores em publicação datada de 1935. Esse estudo também apontou que quando a restrição calórica é implementada após a puberdade ela é capaz de aumentar a expectativa de vida por prevenir ou atenuar a gravidade das doenças crônicas (29). O envelhecimento em ratos traz consigo características como aumento do peso corporal, especialmente condicionado ao tecido adiposo, o qual tende a se concentrar em áreas específicas do corpo. Nos seres humanos, de maneira similar, eleva-se particularmente o tecido adiposo visceral, resultando em maior circunferência da cintura, quadro que se configura obesidade abdominal, ainda que o indivíduo seja eutrófico. Tal condição está fortemente associada à síndrome metabólica que se relaciona a uma série de distúrbios metabólicos (1).

Apesar de a restrição calórica ter sido apontada como elemento para longevidade há quase 70 anos, a base molecular de como ela influencia nesse processo ainda não é clara. Sua complexidade reside em efeitos múltiplos que incluem alterações metabólicas, neuro-

endócrinas e apoptose, que variam em intensidade e exibem diferenças marcantes entre os sistemas de órgãos específicos. Vários modelos têm sido levantados para tentar responder esses processos, mas nenhum resultado ainda foi satisfatório para integrar todos os efeitos da restrição calórica (30).

Estudos experimentais realizados com roedores apontaram que em parte a restrição de calorias aumenta a longevidade e previne ou retarda a ocorrência de doenças crônicas como o diabetes, a aterosclerose, a cardiomiopatia, tumores, doenças auto-imunes, renais e respiratórias (29, 31-35). De forma semelhante, estudos com macacos Rhesus vêm demonstrando efeitos similares aos identificados com roedores submetidos à restrição calórica, o que reforça sua validade por também apontarem efeitos benéficos sobre o metabolismo, ações hormonais, processos inflamatórios e na composição corporal (36, 37). Entre suas evidências cabe destacar a melhoria nos fatores de risco para doenças cardiometabólicas, incluindo alterações na pressão arterial, perfil de lipídios séricos, na glicemia e na concentração e sensibilidade à insulina (22, 38).

Confirmando os resultados supracitados, o "*Experimento Starvation Minnesota*," realizado entre os anos 1944 e 1945 na Segunda Guerra Mundial, forneceu os primeiros resultados da avaliação sistemática dos efeitos da restrição calórica grave entre indivíduos eutróficos. Neste estudo, a redução da ingestão de calorias foi de 45% durante 24 semanas, para a qual foram identificados muitos efeitos potencialmente benéficos, similares aos observados em estudos posteriores conduzidos com modelos animais. Entre os efeitos foram apontados diminuição da gordura corporal e da pressão arterial, melhoria do perfil lipídico, redução sérica de T3 e da frequência cardíaca de repouso (39). Tais efeitos vêm sendo atribuídos especialmente à diminuição das concentrações plasmáticas de citocinas inflamatórias induzida pela restrição de calorias, a qual causa também um aumento, ainda que modesto, nos níveis de cortisol circulante, os quais resultam em uma redução sistêmica da atividade inflamatória (40-44).

Muitos dos efeitos de restrição de calorias vêm sendo correlacionados às expressões gênicas envolvidas, por exemplo, na resistência ao estresse, proteção contra dano oxidativo e daqueles relacionados à mediação da inflamação (45). Além disso, as evidências existentes apontam que a restrição calórica por 16 semanas diminui os níveis de acetil CoA carboxilase (ACC) produzida pelo fígado, enzima que limita a biossíntese de ácidos graxos para cerca de 25% da linha de base (46).

Os benefícios da restrição calórica sobre as doenças cardiometabólicas são inquestionáveis. No entanto, exacerbados valores de restrição calórica pode induzir um estado de desnutrição que pode percorrer com condições inflamatórias, hipermetabólicas e/ou hipercatabólicas de acordo com a Declaração de Consenso da Academia de Nutrição e Dietética / Sociedade Americana de Nutrição Parenteral e Enteral. Ainda de acordo com esse consenso, o estado nutricional pode ser relacionado com baixos níveis plasmáticos de albumina e as suas principais causas estão associadas à baixa ingestão de calorias, proteínas e outros nutrientes necessários para a manutenção e reparação dos tecidos (22, 47, 48). Alguns estudos demonstraram que os benefícios da restrição calórica ocorrem com valores de restrição máximos de 55-60% em comparação com a ingestão de base. Se os animais são expostos a uma restrição calórica superior a esses valores eles podem desenvolver condições clínicas negativas associadas à desnutrição, dentre elas condições inflamatórias que também estão presentes em indivíduos obesos (25, 49, 50).

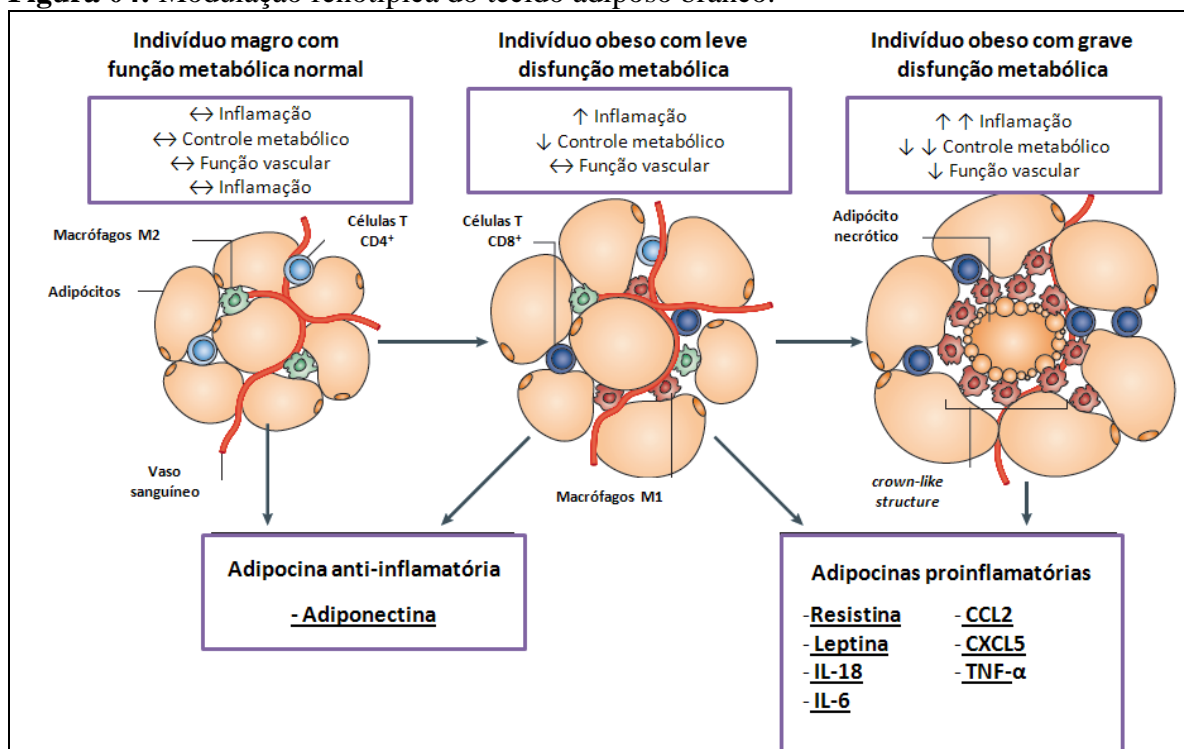
1.3 Manifestações inflamatórias associadas à obesidade e desnutrição.

Estudos clínicos e epidemiológicos têm descrito uma ligação clara entre o desenvolvimento de respostas inflamatórias e doenças metabólicas, em especial no contexto de obesidade e DM tipo 2 (51).

Tradicionalmente, o tecido adiposo branco (TAB) era visto apenas como reserva energética, entretanto, novos estudos tem classificado esse tecido como um órgão endócrino e o principal responsável pela produção de citocinas (adipocinas) que atuam como mediadores e reguladores de respostas imunes e inflamatórias (51-53) (Figura 4). Existem várias evidências que sugerem que o TAB torna-se hipertrofiado na obesidade devido à infiltração de macrófagos que secretam citocinas pró-inflamatórias, incluindo factor de necrose tumoral (TNF- α) e algumas interleucinas, como a IL-6 (50). Essa produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias em indivíduos obesos tem sido associado às doenças cardiometabólicas por alterar o equilíbrio entre as adipocinas anti e pró-inflamatórias no TAB (51-53).

O TAB é constituído principalmente de adipócitos, embora outros tipos de células sejam fundamentais para o seu crescimento e função, incluindo os pré-adipócitos, macrófagos, linfócitos, fibroblastos e células vasculares (51, 54). O acúmulo de macrófagos no TAB de indivíduos obesos e em modelos animais de obesidade é proporcional à adiposidade, assim como a perda de peso resulta numa redução sustentada no número de macrófagos de tecido adiposo, que é acompanhado por uma diminuição do perfil inflamatório (54-56). Os macrófagos também são mais abundantes no tecido adiposo visceral que no subcutâneo, fator que tem sido associado ao maior risco de desenvolvimento de resistência insulínica (57).

Figura 04: Modulação fenotípica do tecido adiposo branco.



Fonte: Adaptado de Ouche *et al.* (51)

Em oposição ao estado de obesidade, indivíduos expostos a valores extremos de restrição calórica podem desenvolver estado de desnutrição que pode cursar com condições inflamatórias (47, 48).

Entende-se como desnutrição qualquer desequilíbrio nutricional (58). Indivíduos que não ingerem a quantidade adequada de calorias, proteínas ou outros nutrientes necessários para a manutenção e reparação tecidual estão sujeitos ao desenvolvimento de desnutrição (59, 48).

Aumento da necessidade diária de calorias, absorção deficiente e alteração no transporte de nutrientes são outras causas em potencial da desnutrição (60). Portanto, devem-se estabelecer os limites da restrição calórica para evitar que indivíduos sejam expostos a valores críticos de restrição e o desenvolvimento de desnutrição e de suas co-morbidades associadas.

Estudos realizados nos últimos anos tem demonstrado que o sistema renina-angiotensina (SRA) modula de forma importante a função endócrina do tecido adiposo branco (61). Desta forma, é relevante compreender o funcionamento do SRA e sua interação com o metabolismo do TAB.

1.4 Sistema Renina-Angiotensina (SRA)

O sistema renina-angiotensina se constitui de uma coordenada rede hormonal circulante iniciada pela liberação da enzima renina, sintetizada pelas células justaglomerulares das arteríolas aferentes renais. A renina é liberada por excitação agindo enzimaticamente sobre o angiotensinogênio (AGT) produzido pelo fígado, hidrolisando-o em um decapeptídeo, a angiotensina I (Ang I). Este peptídeo é catabolizado pela enzima conversora de angiotensina (ECA) em um octapeptídeo denominado de Angiotensina II (Ang II). Ela apresenta relevantes ações biológicas e age através de seus receptores específicos AT1 e AT2. A Ang II também pode ser formada por outras vias independentes da renina, pela ação de catepsinas e quimases. Outro importante componente desse sistema é o heptapeptídeo Ang-(1-7) que, agindo via receptor Mas, promove geralmente ações antagônicas às geradas pela Ang II no receptor AT1 e similares as ações da Ang II no receptor AT2. Ele pode ser produzido a partir da Ang II ou da Ang I através da ação da ECA 2, PEP (prolil-endopeptidase) e NEP (neutral-endopeptidase) (62).

A Ang II é um dos mais potentes vasoconstritores conhecidos e é considerado o principal componente biologicamente ativo do SRA, exercendo seus efeitos via dois receptores distintos, AT1 e AT2, sendo que os mais conhecidos efeitos fisiológicos e patológicos da Ang II são mediados via receptores AT1, pela associação de múltiplas interações com cascatas de transdução de sinais que comandam diversas ações biológicas (63).

Dentre as principais ações via AT1, a Ang II induz vasoconstrição vascular (preferencialmente renal, cerebral e coronariana), a retenção renal de sódio (via liberação de aldosterona), retenção renal de água (via liberação de vasopressina), supressão da renina (por “feedback” negativo), hipertrofia de músculo liso e cardiomiócitos, estimulação de fibrose no miocárdio e vascular, efeito inotrópico positivo (contração de cardiomiócitos), ativação do sistema nervoso simpático (SNS), estimulação da secreção endotelial e estimulação da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (63). Sabe-se que doenças como hipertensão, hiperlipidemia, diabetes e aterosclerose estão correlacionadas com a disfunção vascular e mudanças estruturais, incluindo disfunção endotelial, alteração da contratilidade e remodelamento vascular, alterações estas que podem ser geradas por aumento da atividade da Ang II nos vasos (64). Os eventos celulares relacionados com esse processo envolvem mudanças no músculo vascular liso com relação ao crescimento, apoptose, migração celular, inflamação e fibrose (63).

Os efeitos da Ang II no receptor AT2, na maioria das vezes, são opostos às ações mediadas pelo receptor AT1. Os principais efeitos de sua ativação são o antiproliferativo, a inibição do crescimento celular e diferenciação celular, reparação tecidual, apoptose, vasodilatação, desenvolvimento dos rins e trato urinário e proteção contra isquemia cardíaca (65).

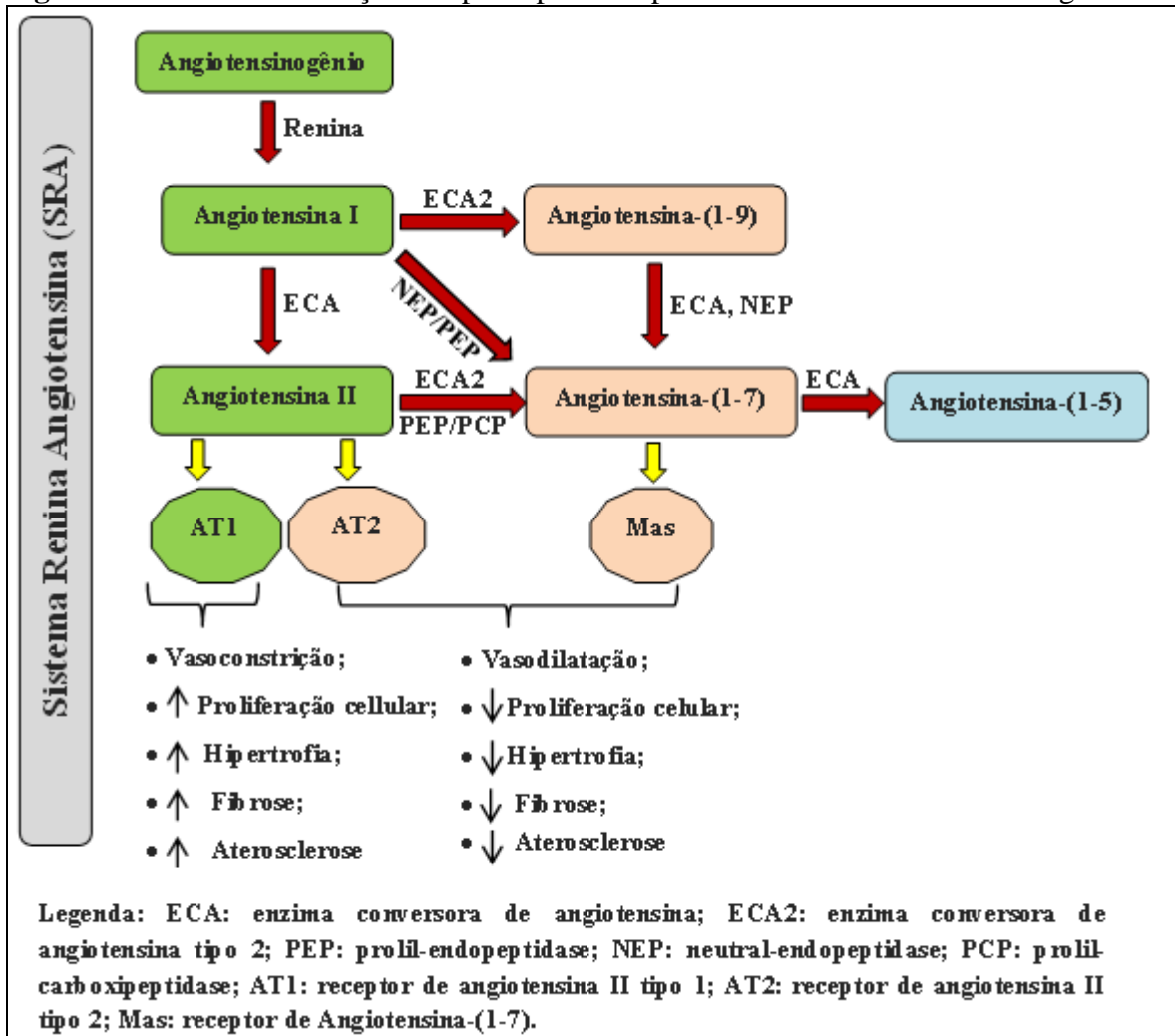
A Ang-(1-7) é um importante metabólito da Ang II, uma vez que estudos recentes já apontam seu possível papel terapêutico (66). Sabe-se que a Ang-(1-7) libera óxido nítrico (NO) e prostaglandinas (PGI₂) causando vasodilatação, inibindo a proliferação celular muscular e a trombogênese (67, 68), atenuando o efeito vasoconstritor da Ang II (68, 69) e inibindo a ECA (70). Desequilíbrios na interação harmônica entre Ang II e Ang-(1-7) parecem contribuir para o início e desenvolvimento de doenças como a hipertensão.

A formação de Ang-(1-7) é controlada por pelo menos três enzimas que estão presentes na circulação sanguínea e em alguns tecidos (71, 72), podendo assim ser sintetizada a partir da Ang I pela ação das endopeptidases teciduais denominadas PEP e NEP (73) ou sendo formada a partir da Ang II pela ação da PEP e da prolil-carboxipeptidase (PCP). Recentemente, foi descrita uma nova via de formação da Ang-(1-7) por ação da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA 2) (74, 75). A ECA 2 é responsável pela conversão da Ang I em angiotensina-(1-9), que pode ser posteriormente convertida em Ang-(1-7) por ação da ECA ou de outras peptidases (75). Além disso, a ECA 2 promove a conversão direta da Ang II em

Ang-(1-7) com afinidade superior à que hidrolisa a Ang I. A Ang-(1-7) pode ser hidrolizada pela ECA formando a angiotensina-(1-5) e a angiotensina-(1-3). Esta parece ser uma importante via de inativação da Ang-(1-7) circulante e, possivelmente, também da forma tecidual desse peptídeo (74).

Vários trabalhos mostram que a Ang-(1-7) participa do controle do balanço hidroeletrólítico (40), promove inibição da proliferação de células musculares lisas vasculares (76), inibe o crescimento de miócitos cardíacos (77), apresenta efeito antitrombótico (67) e antiarrítmico dentre outros. A produção renal de Ang-(1-7) possui um importante papel na regulação da pressão arterial. Em ratos, a Ang-(1-7) apresenta ação natriurética, tanto em rins isolados, como em animais anestesiados (78), sugerindo que esse peptídeo exerce um efeito vasodilatador na microcirculação renal, com efeito anti-hipertensivo. Atualmente, sabe-se que boa parte das ações da Ang-(1-7) ocorrem por estímulo do seu receptor específico, o Mas. A primeira evidência da existência de um receptor específico para a Ang-(1-7) foi obtida por Campagnole-Santos e colaboradores em 1992 (79), que observaram a capacidade da Ang-(1-7) de induzir, contrariamente à Ang II, um aumento significativo na sensibilidade do controle barorreflexo. Vários outros estudos sugeriram a existência de um receptor seletivo para mediar as ações da Ang-(1-7) (80). A Figura 05 mostra de forma esquemática a formação dos principais componentes do Sistema Renina Angiotensina e as principais enzimas envolvidas nesse processo. Ela também descreve os principais efeitos fisiológicos relacionados aos eixos regulatório ECA/AngII/AT1, considerado vasconstritor e pró-hipertensivo, e contra regulatório ECA2/Ang-(1-7)/Mas, com atividade vasodilatadora e anti-hipertensiva, do sistema renina angiotensina (81, 82).

Figura 05 – Rede de formação dos principais componentes do Sistema Renina Angiotensina.



Fonte: Adaptado de Santos *et al.* (81).

Neste contexto dos eixos regulatório e contra regulatório do SRA, existem vários trabalhos demonstrando que os efeitos anti-hipertensivos dos antagonistas de receptores de AT1, como a candesartana, estão em partes relacionados ao desvio do eixo regulatório para o eixo contra-regulatório ao favorecer a síntese de Ang-(1-7) e sua atividade vasodilatadora (83). Outros trabalhos sugerem a associação de antagonistas dos receptores AT1 com Ang-(1-7) como um potencial terapêutico no tratamento de doenças coronarianas (84). Os inibidores da enzima conversora de angiotensina, como o lisinopril, também são capazes de deslocar o SRA a favor do eixo contra-regulatório ECA2/Ang-(1-7)/Mas ao elevar os níveis de Ang-(1-7) (85).

1.5 Interação do Sistema Renina-Angiotensina e Metabolismo

Estudos realizados tem descrito a presença de vários componentes do SRA no tecido adiposo (86). No quadro de síndrome metabólica já foram descritos aumento da atividade da renina plasmática, maior nível plasmático de angiotensinogênio, maior atividade da ECA e maior nível plasmático de aldosterona (61). Os níveis de mRNA de AGT são 60% maiores no tecido adiposo do que no fígado, que é considerado principal fonte de AGT (87). Além disso, a expressão de AGT é mais elevada em adipócitos viscerais do que em adipócitos subcutâneos, tanto em ratos como em humanos (88). Os adipócitos de ratos e de humanos apresentam os dois subtipos de receptores angiotensinérgicos, AT1 e AT2, embora ainda não estejam claras as funções específicas desencadeadas por esses receptores nessas células. In vivo, a expressão do gene para o receptor AT1 no tecido adiposo parece ser dependente da idade, uma vez que foi observada uma menor densidade de receptores AT1 em ratos Sprague-Dawley (SD) idosos quando comparados com ratos jovens. Os sítios de afinidade entre o receptor AT1 e a angiotensina II têm cinética semelhante aos de outros órgãos alvo do peptídeo sendo a densidade desse receptor no tecido adiposo semelhante à do coração (89).

Estudos utilizando cultura de células adiposas mostraram que o AGT e a Ang II participam da regulação e diferenciação do fenótipo do adipócito. É provável que o aumento no conteúdo de triglicerídeos e da atividade de duas enzimas, a sintetase de ácidos graxos e a glicerol-3-fosfato desidrogenase, sejam mediadas pela Ang II, mostrando que esse peptídeo controla a adiposidade pela regulação da síntese e armazenamento de lipídios (90). É interessante observar que em cultura de células adiposas, a Ang II é um fator adipogênico, enquanto no animal vivo, atua como importante redutor do peso e da massa adiposa. Sabe-se que existe uma correlação significativa entre a pressão arterial, o índice de massa corporal e os níveis do AGT plasmático em indivíduos normotensos e magros (61). Aproximadamente 20% da variação do AGT plasmático são determinados pelos níveis plasmáticos da leptina, que serve como um indicador da massa de tecido adiposo, sugerindo que esse tecido contribua para os níveis de AGT plasmático (90).

Estudos experimentais sugerem que o SRA do tecido adiposo é influenciado pelo grau de obesidade. Outros estudos tem demonstrado que o TAB é regulado por fatores hormonais e nutricionais e que a Ang II pode modular o fluxo sanguíneo por esse tecido através de fatores

de crescimento e pelo metabolismo local. Assim, a ativação do SRA pode determinar efeitos deletérios locais e sistêmicos em obesos e pode contribuir para o surgimento da hipertensão arterial sistêmica (HAS) e outras doenças. A resistência à insulina por sua vez, está associada com o aumento da liberação de ácidos graxos livres que são convertidos no fígado em triglicerídeos e secretados em partículas lipoprotéicas de muito baixa densidade (VLDL-C) (90).

A resistência à insulina induz uma redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) em modelos experimentais e em indivíduos saudáveis. Indivíduos insulino-resistentes apresentam resposta vasodilatadora endotélio-dependente prejudicada e a disfunção endotelial pode ser também detectada em indivíduos saudáveis com primeiro grau de parentesco com os indivíduos DM tipo 2 (91). Portanto, a disfunção endotelial é um elo comum entre a HAS, DM tipo 2 e a síndrome metabólica.

A Ang II está altamente correlacionada com a disfunção endotelial presente nos indivíduos hipertensos, diabéticos, obesos e com a síndrome metabólica. Esse peptídeo está implicado com o crescimento celular e com o processo inflamatório. Desta forma, o estresse oxidativo provocado pela Ang II pode resultar em aumento da produção de endotelina (ET-1), das moléculas de adesão como a molécula de adesão da célula vascular (VCAM-1) e a molécula de adesão intercelular-1(ICAM-1), fator nuclear-k B (NF-kB), interleucina 6 (IL-6) dentre outros mediadores inflamatórios (92).

Além da contribuição do SRA, principalmente via Ang II, na gênese da síndrome metabólica já descrita acima, interações em diferentes níveis desse sistema com a insulina são implicadas como fator fundamental para o desenvolvimento da DM tipo 2 e síndrome metabólica (57). Estudos sugerem que a Ang II, via receptor AT1, pode modular as ações da insulina. Assim, a ativação do SRA induz o aparecimento de resistência às ações metabólicas da insulina, provocando hiperglicemia e elevação dos níveis de colesterol VLDL, triglicérides, potencializando o efeito proliferativo da insulina. Além disso, a hiperglicemia e a hiperinsulinemia ativam o SRA através do aumento da expressão de AGT, Ang II e receptores AT1, que podem assim induzir aparecimento do quadro de hipertensão arterial, disfunção cardiovascular e renal (93). Dessa forma, substâncias produzidas pelo tecido adiposo podem interagir com o SRA reforçando suas ações, participando então das alterações cardiovasculares e renais associadas à obesidade e à síndrome metabólica (94).

Os efeitos da restrição calórica sobre o sistema renina-angiotensina ainda não foram discutidos na literatura científica. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o metabolismo, os componentes do SRA e a atividade inflamatória no tecido adiposo de camundongos submetidos a diferentes graus de restrição alimentar sobre dietas normolipídica e hiperlipídica, abrindo perspectivas de desenvolver novas propostas de intervenção para o controle de doenças cardiometabólicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar o metabolismo, componentes do sistema renina-angiotensina e atividade inflamatória no tecido adiposo de camundongos submetidos à restrição alimentar sobre dietas normolipídica e hiperlipídica.

2.2 Objetivos específicos

- Mensurar os efeitos da restrição alimentar sobre o peso corporal, ingestão alimentar e adiposidade corporal;
- Mensurar os efeitos da restrição alimentar sobre o perfil glicêmico e lipídico;
- Mensurar os efeitos da restrição alimentar sobre os valores de albumina plasmática.
- Analisar a expressão tecidual de mediadores pró-inflamatórios e do sistema renina-angiotensina no tecido adiposo epididimal.
- Comparar a histologia dos adipócitos do tecido adiposo epididimal entre os grupos de animais submetidos à restrição alimentar.

3 PRODUTOS

3.1 Produto 1: “*OBESITY AND MALNUTRITION: SIMILARITY OF PRO-INFLAMMATORY STATES BY MODULATION OF THE RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM*”, enviado para publicação no periódico *Hypertension*.

**OBESITY AND MALNUTRITION: SIMILARITY OF PRO-INFLAMMATORY
STATES BY MODULATION OF THE RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM**

Thales de Almeida Pinheiro^{1,2}, João Marcus Oliveira Andrade¹, Thaisa de Almeida Pinheiro²,
Emílio César Neves Ferreira², Alanna Fernandes Paraíso¹, Lucas Barros de Oliveira¹, Ugo
Borges Pinho¹, André Luiz Sena Guimarães¹ (PhD), Alfredo Mauricio Batista de Paula¹
(PhD) Antônio Prates Caldeira^{1,2} (PhD), Sérgio Henrique Sousa Santos^{1,3,#}(PhD).

¹Laboratory of Health Science, Postgraduate Program in Health Sciences, Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes), Montes Claros, MG, Brazil.

²Integrated Colleges Pythagorean of the Montes Claros (FIP), Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

³Pharmacology Department; Biological Sciences Institute. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Minas Gerais, Brazil.

To whom correspondence may be addressed

Short Title: Obesity and malnutrition: modulates RAS

Footnotes

Correspondence may be addressed to:

Dr. Sérgio H S Santos

Departamento de Farmacologia

Universidade Federal de Minas Gerais

Avenida Antônio Carlos 6627-ICB – 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil

FAX/Phone: (55-31)3409-2695/2712 - Email: sergiosousas@hotmail.com

ABSTRACT

The increasing prevalence of obesity worldwide has a great impact on public health as the excessive accumulation of body fat is considered a risk factor for cardiovascular disease, and it is one of the main features of the metabolic syndrome (MS). The purpose of this study was to evaluate the metabolic profile, inflammatory markers and the renin-angiotensin system (RAS) expression in the adipose tissue of mice subjected to food restriction. Male Swiss mice were divided into eight groups and were fed for eight weeks with: G1: Standard Diet (ST) *ad libitum*; G2: ST-20% food restriction; G3: ST-40% food restriction; G4: ST-60% food restriction; G5: High-Fat Diet, obese (HFD) *ad libitum*; G6: HFD-20% food restriction; G7: HFD-40% food restriction; G8: HFD-60% food restriction. Food intake, body weight, glycemic parameters, lipid profile and albumin were assessed. The weight of adipose tissues and the area of adipocytes from epididymal adipose tissue were analyzed. The expression of AGT, ACE, ACE2, IL-6 and TNF- α in epididymal adipose tissue was evaluated by PCR. The main findings showed a reduced body weight, improved glycemic and lipid profile, reduced albumin, decreased adipose tissues weight and reduced adipocyte size in the epididymal adipose tissue of mice submitted to food restriction under standard or high-fat diet. A diminished expression of IL-6, TNF- α , AGT and ACE was also detected in the 20% and 40% treatment groups, and increased expression in the 60% food restriction groups. In conclusion, we observed that 20% and 40% food restriction improved metabolism, controlling the RAS and cytokine expression in mice, while a severe 60% food restriction (malnutrition) produced a new pro-inflammatory profile with increased AGT and ACE expression.

Keywords: Food restriction; malnutrition; standard diet; high-fat diet; cytokines; renin-angiotensin system; metabolism.

INTRODUCTION

The increasing prevalence of obesity worldwide (1, 2) has a great impact on public health as the excessive accumulation of body fat is considered a risk factor for cardiovascular disease, and it is one of the main features of the metabolic syndrome (MS) (3). The main comorbidities of MS include hypertension, dyslipidemia, stroke, type-2 diabetes mellitus (T2DM) and some types of cancer (4). Obesity is characterized by the accumulation of body fat resulting from an imbalance between food intake and energy expenditure (3, 5). Recently, obesity has been described as a proinflammatory state associated with elevation of tissue and circulating levels of proinflammatory enzymes, pro-coagulant factors, cytokines and chemokines, demonstrating that adipose tissue modulate not only the adipose tissue biology, but also the reproductive and endocrine systems, immunity, inflammation and insulin sensitivity (6). There are several evidences suggesting that white adipose tissue (WAT) becomes sore during adipose tissue hypertrophy due to macrophages infiltration that secrete proinflammatory cytokines, including tumor necrosis factor $TNF-\alpha$ and some interleukins, such as IL-6 (7).

There are a growing number of studies describing the importance of the renin-angiotensin system (RAS) in metabolic regulation, cardiovascular and inflammatory diseases development (8-10). Various components of the RAS have been identified in the adipose tissue (11). Recent studies have shown that RAS modulates significantly the metabolism and endocrine function of adipocytes. It has been described in the MS framework an increased plasma renin activity, increased angiotensinogen plasma levels, increased ACE activity, and increased aldosterone plasma levels (12). It is known that exist a significant correlation between blood pressure, body mass index, and plasma AGT levels in normotensive and lean individuals (12).

Experimental studies suggest that RAS in adipose tissue regulated by hormonal and nutritional factors is influenced by the obesity degree and that Ang II can modulate blood flow by growth factors and local metabolism. Thus, RAS activation can determine local and systemic deleterious effects in obese and can thus contribute to the emergence of systemic hypertension and other diseases. Insulin-resistant individuals show an impaired endothelium-dependent vasodilation and endothelial dysfunction (13).

Studies in the literature suggest that Ang II, through AT1 receptor may modulate the insulin actions. So, the RAS activation induces the emergence of resistance to the insulin metabolic actions causing hyperglycemia and elevated cholesterol levels (VLDL) and triglycerides, beyond enhancing insulin proliferative effect. Furthermore, hyperglycemia and hyperinsulinemia activate the RAS by increasing the expression of AGT, Ang II and AT1 receptors which can thus induce the appearance of hypertension, cardiovascular and renal disorders (14). Thus, substances produced by the adipose tissue may interact with RAS reinforcing their actions during obesity and metabolic syndrome (15).

Caloric restriction is characterized by a low-calorie dietary regimen without causing malnutrition and was first described as a longevity predictor in rodents as published in 1935. Experimental studies in rodents showed that partly calorie restriction increases longevity and prevents or delays the occurrence of chronic diseases such as diabetes, atherosclerosis, cardiomyopathy, tumors, autoimmune diseases, renal and respiratory problems (16-18). Rhesus monkeys studies have shown similar effects to those identified in rodents under caloric restriction, which reinforces its validity by also suggesting beneficial effects on metabolism, hormonal actions, inflammation and body composition (19). Among its evidence, we should emphasize the improvement in risk factors for cardiometabolic diseases, including changes in blood pressure, serum lipid profile, glycemic parameters and insulin sensitivity (20, 21). However, exacerbated caloric restriction values may induce a malnutrition state and

according to the Consensus Statement of the Academy of Nutrition and Dietetics / American Society for Parenteral and Enteral Nutrition malnourished individuals may present inflammatory, hypermetabolic and/or hypercatabolic conditions. Still according to this consensus, malnutrition may be related to low albumin plasma levels and its main causes are reduced intake of calories, proteins and other nutrients needed for tissue maintenance and repair (22).

Some researchers have shown that the maximum effect occur with a restriction from 55 to 60% compared to baseline intake. If animals are exposed to a greater restriction of these values they may develop a malnutrition state with negative effects. There are a few studies in this calorie restriction transition range which show the maximum constraint associated with beneficial effects (23).

Thus, the purpose of the present study was to evaluate the metabolic profile and expression of inflammatory markers and RAS components in adipose tissue of mice submitted to different food restriction degrees and fed with high-fat and standard diets, opening up the prospect of developing new intervention proposals to combat the cardiometabolic diseases.

METHODS

Animals - The experiment was conducted with sixty-four Swiss mice (male with four week old) divided in eight groups (n=8 each) and fed with the following respective experimental diets for 8 weeks. The groups were divided in: G1: Standard Diet (ST) *ad libitum*; G2: ST-20% food restriction; G3: ST-40% food restriction; G4: ST-60% food restriction; G5: High-Fat Diet (HFD) *ad libitum*; G6: HFD-20% food restriction; G7: HFD-40% food restriction; G8: HFD-60% food restriction. All experimental protocols were performed in accordance

with the international guidelines for animal care and approved by local authorities. The animals were maintained under controlled light and temperature conditions.

Food Restriction – The groups of animals fed with standard and high-fat diet given ad libitum, had their food intake measured in a daily basis. From the food intake of these groups, the food restriction of 20, 40 and 60% was then calculated.

Diets - Standard diet (Purina - Labina®) used for regular mice maintenance is composed by 66% carbohydrate, 23% of protein and 11% of fat with a total of 3.95 kcal per 1g of diet. High-fat diet was composed by 24% of carbohydrate, 15% of protein, and 61% of fat, presenting a total of 5.28 kcal per 1g of diet (35). The High-fat diet was prepared according to the standards of the Official Analytical Chemists Association as described previously (24, 25). All of the high-fat diet components were purchased from Rhooster® LTDA (São Paulo, SP, Brazil).

Measurements of body weight, food intake, and tissue collection - Food intake and body weight were measured every day during treatment. Overnight fasted mice were killed by decapitation and blood samples and white adipose tissues (epididymal, retroperitoneal and mesenteric) were collected, weighed, immediately frozen in dry ice and stored at -80°C for posterior analysis.

Glucose tolerance and insulin sensitivity tests (TTG and TSI) - For the glucose-tolerance test, D-glucose (2 mg/g of body weight) was intraperitoneally injected into overnight fasted mice. Glucose levels from tail blood samples were monitored at 0, 15, 30, 60 and 120 min after injection. Insulin sensitivity tests were performed on morning with the animals in the fed

state, after intraperitoneal injection of insulin (0.75 U/kg body weight). Tail's blood samples were taken at time points 0, 15, 30 and 60 min after injection for the measurement of blood glucose levels.

Determination of blood measurements - Serum was obtained after centrifugation (4000 x g for 7 min at 4 °C). Total serum cholesterol, triglycerides, high-density protein (HDL), glucose and albumin were assayed using enzymatic kits (Wiener®, Argentina). Measurements were made in Wiener BT-3000 plus Chemistry Analyzer (Wiener®, Argentina).

Reverse transcription and Real Time PCR - Total RNA from the epididymal adipose tissue was prepared using TRIzol reagent (Invitrogen Corp.®, San Diego, California, USA), treated with DNase and reverse transcribed with M-MLV (Invitrogen Corp.®) using random hexamer primers. Levels of AGT, ACE, ACE2, IL-6 and TNF- α mRNA were determined by real-time PCR (qRT-PCR) using SYBR Green reagent (Applied Biosystems®, USA) in a PlusOne platform (Applied Biosystems). Gene expression was normalized to the endogenous GAPDH. The relative comparative CT method of Livak and Schmittgen (26) was applied to compare gene expression levels between groups, using the equation $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Hematoxylin and eosin staining - Epididymal adipose tissue samples from mice were fixed in 10% neutral-buffered formalin at 4°C overnight, dehydrated through a graded alcohol series, xylene and paraffin, and then embedded in paraffin. Sections of 5 μ m were prepared for H&E. Images (x10 ocular and x40 objective lenses) were captured with Evolution LC Color light camera (Media Cybernetics®, USA). A total area of 1.84 mm², containing at least 100 fat cells for each sample, was measured using the Image J Software (ESTADO, USA®).

Statistical analysis - All data were transferred to GraphPad Prism software (Version 5.0®, San Diego, California, USA) and analyzed with 95% confidence ($p < 0.05$). Data are expressed as the mean \pm SEM. The statistical significance of differences in mean values between mice groups was assessed by One-Way ANOVA followed by Bonferroni post-test. To TTG and TSI were used Two-Way ANOVA tests followed by Bonferroni post-test.

RESULTS

According to Figure 1A, we observed that there was significant reduction in the rate of food intake for different groups undergoing food restriction on standard diet ($P < 0.0001$). These data were accompanied by a decrease in body weight of the different groups at the end of treatment ($P < 0.0001$; Fig. 1B e C). Significant reduction in body fat was observed in the treatment groups fed with the standard diet (ST-20% FR, ST-40% FR and ST-60% FR) in relation to control group: epididymal white adipose tissue ($P < 0.0001$; Fig. 1D), retroperitoneal ($P = 0.0007$; Fig. 1E) and mesenteric ($P = 0.0038$; Fig. 1F). A significant decrease in adipocyte area was observed in the treatment groups from histological analysis ($P < 0.0001$; Fig. 1G and H).

According to Figure 2A, analysis of treatment with high-fat diet showed a significant reduction in food intake values for the different groups subjected to food restriction ($P < 0.0001$). Regarding the body weight, it was observed a significant decrease in body weight of different groups at the end of treatment compared to HFD ($P < 0.0001$; Fig. 2B and C). On body adiposity, significant reduction in body fat was observed in the treatment groups fed with high fat diet (HFD-20% FR, HFD-40% FR and HFD-60% FR) compared to HFD group: epididymal white adipose tissue ($P < 0.0001$, Fig 2D), retroperitoneal ($P = 0.0002$; Fig. 2E) and mesenteric ($P < 0.0001$; Fig. 2F). Decrease in the area of adipocytes from histological

analyses was observed in all treatment groups compared to the HFD group ($P < 0.0001$, Figure 2G and H).

For the TSI significant reduction was observed in blood glucose levels at all times of measurement (0, 15, 30 and 60 minutes) in the treatment groups in relation to ST group (Fig. 3A). As regards the TTG (Fig. 3B), there was a measure reduction to the group ST-20% FR (15 and 30 minutes), ST-40% FR (15, 30, 60 and 120 minutes) and ST-60% FR (0, 15, 30, 60 and 120 minutes) compared to the ST group.

For the group involving fat diet has been shown in TSI a significant reduction in blood glucose levels in HFD-20% FR (15 minutes), HFD-40% FR (15 and 30 minutes) and HFD-60% FR (0, 15, 30, 60 and 120 minutes) groups compared to the HFD group. There has been also a significant decrease in HFD-60% FR (0, 15, 30, 60 and 120 minutes) group for the groups HFD-20% FR and HFD-40% FR (Fig. 3C). In relation to TTG (Fig. 3D) there was a reduction in measures to the group HFD+20% FR (15, 30 and 60 minutes) HFD-40% FR (15, 30, 60 and 120 minutes) and HFD-60% FR (0, 15, 30, 60 and 120 minutes) compared to the HFD group. It was also evidenced significant reduction in the HFD-60% FR group compared to HFD-20% FR and HFD-60% FR groups at all times.

Plasmatic analyzes showed a glucose and triglyceride levels reduction in the ST-20% FR, ST-40% FR and ST-60% FR groups in relation to ST group ($P < 0.0001$, Table 1). Significant reduction was observed in the ST-60% FR group in relation to ST group for total cholesterol ($P = 0.0592$, Table 1) and HDL-cholesterol ($P = 0.0328$, Table 1). For albumin levels, significant reduction was observed in the ST-60% FR group compared to the ST group ($P = 0.0026$, Table 1).

For the group involving high-fat diet, plasmatic analyzes showed a reduction in glucose levels in all treatment groups (HFD-20% FR, HFD-40% FR e HFD-60% FR) compared to the HFD ($P < 0.001$; Table 2). Total cholesterol levels were decreased in the

group HFD-40% FR e HFD-60% FR in relation to HFD group HFD ($P=0.0022$; Table 2) and HDL-cholesterol HFD-60% FR in relation to HFD group ($P = 0.0549$, Table 2). Levels of total triglycerides were decreased in HFD-60% FR group in relation to HFD group ($P = 0.0032$, Table 2). For albumin levels, significant reduction was observed in the HFD-60% FR group compared to the HFD group ($P = 0.0006$, Table 2).

Analysis by quantitative real time PCR (qRT-PCR) showed a significant reduction in AGT expression in groups ST-20% FR and ST-40% FR in relation to ST group. Furthermore, there was no observed association between groups ST-60% FR and ST, however there was a significant increase in the ST-60% FR group in relation to ST-40% FR (Fig. 4A). In relation to the ACE expression levels, the results showed a decreasing in ST-20% FR and ST-40% FR groups in relation to ST group. Additionally was not observed association between the groups ST+60% FR and ST, but there was a significant increase in the ST-60% FR group in relation to ST-40% FR similarly to AGT expression (Fig. 4B). To analyze the expression of ACE2 there was no significant difference between the analyzed groups (Fig. 4C).

For the inflammatory markers (Fig. 4D), there is a significant reduction of IL-6 expression in the ST-40% FR group compared to ST group. However, there was no significant difference between the ST-60% FR group in relation to ST. Additionally, there is a significant IL-6 increase in the ST-60% FR group compared to ST-40% FR group. TNF- α (Fig. 4E) showed similar profile expression to IL-6 with significant reduction in group ST-40% FR compared to ST group and a significant increase in ST-60% FR group compared to the ST-40% FR group. It is also important to note that there was no significant difference between the ST-60% FR group compared to ST.

For the group treated with high fat diet, there was a significant reduction in the AGT expression in HFD-40% FR group compared to HFD groups (Fig. 5A). Additionally, there was increased expression in the HFD-60% FR group compared to HFD-20% FR and HFD-

40% CR groups. For the ACE expression (Fig. 5B) it is verified a significant reduction in the HFD-20% FR, HFD-40% FR, and HFD-60% FR groups in relation to the HFD group. To the analysis of the ACE2 expression, there was no significant difference between the analyzed groups (Fig. 5C).

For inflammatory markers, a significant decrease was observed in the IL-6 expression levels in the HFD-40% FR group compared to HFD group. However, no significant difference between the HFD-60% FR group compared to HFD. Additionally, there is a significant increase in IL-6 expression in the HFD-60% FR group compared to HFD-40% FR group (Fig. 5D). For the TNF- α expression, a significant decrease was found in groups HFD-20% FR and HFD-40% FR compared to HFD (Fig. 5E).

DISCUSSION

The present study evaluated the metabolic profile, inflammatory markers and the renin-angiotensin system (RAS) expression in the adipose tissue of mice subjected to different degrees of food restriction treated with standard (normolipidic) and high-fat (hyperlipidemic) diets. It was noticed a significant reduction in body weight for all groups of both high-fat (obese) and standard diets submitted to food restriction treatments in a proportional way to the food intake imposed on the animals. These findings were associated with an adipose tissue weight reduction in addition to progressive decreased adipocytes diameters. It was also observed an improvement in glycemic profile of the two diet-study groups and a slight improvement in the lipid profile of the animals that underwent the standard-diet, in addition to decreased expression of proinflammatory cytokines up to the restriction of 40% on standard and high-fat diets. These effects were related with the beneficial regulation of gene expression

of the renin-angiotensin system components. Increased adipose pro-inflammatory genes expression was observed in both obese (high-fat) and 60% food restriction states.

The RAS is primarily initiated by the expression of Angiotensinogen (AGT) at different tissues. This protein is produced mainly by hepatocytes; however under pathophysiological conditions, such as metabolic syndrome, adipocytes can become one of the main AGT sources (16). Renin cleaves AGT to produce Ang I, a biologically inactive peptide that is rapidly hydrolyzed by angiotensin-converting enzyme (ACE) to the octapeptide, Ang II. Besides Ang II, several other angiotensin peptides formed from AGT have biological activity; nevertheless the main one is Ang-(1-7), that broadly opposes Ang II actions. Ang-(1-7) can also be produced from the degradation of Ang II through the action of the ACE-homologue enzyme so-called ACE2 (27, 28). Many angiotensin peptides have been implicated in insulin resistance (16, 29) or hypertension associated to obesity and metabolic syndrome (29, 30). It is well known that Ang II by acting through type 1 (AT1) receptors produces endothelial dysfunction and metabolic changes leading to hypertension (31). However, recent studies have demonstrated that Ang-(1-7) by acting at Mas receptor (32) generally opposes several metabolic effects of Ang II, which in turn improves insulin sensitivity, glucose tolerance and type 2 diabetes, reduces body fat, increases adiponectin production and reverses hyperleptinemia (8-10, 33, 34). Indeed, Ang-(1-7) decreases the release of inflammatory mediators by the adipose tissue in obesity animal models (10, 35). In this context, the ACE/AngII/AT1 branch can be considered vasoconstrictor, prohypertensive and proinflammatory while the ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis is considered vasodilator, antihypertensive and anti-inflammatory (36).

Regarding the regulatory and counter-regulatory axis of the RAS, there are several studies showing that the antihypertensive effects of the AT1 receptors antagonists, such as the candesartana, are found to be partly associated with a deviation from the regulatory to the

counter-regulatory axis, thus promoting the synthesis of Ang-(1-7) and its vasodilator activity (37). Other studies suggest the association of AT1 antagonists with Ang-(1-7) as a potential therapeutic alternative for the treatment of coronary diseases (38). The inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE), as the lisinopril, are also capable to dislocate the RAS toward the counter-regulatory axis (ECA2/Ang-(1-7)/Mas), by increasing the levels of Ang-(1-7) (39).

The decrease in body weight of different groups of mice submitted to different degrees of food restriction on standard and high-fat diets can be associated with a reduction of food intake imposed on the animals. Several studies have shown that body weight is associated with food intake (40, 41), and that one of the predisposing factors to obesity is the imbalance between food intake and energy expenditure (3, 5). The weight reduction of epididymal, retroperitoneal and mesenteric adipose tissues with increased food restriction on standard and high-fat diets may be related to the progressive reduction of food intake imposed on the animals. There is ample evidence in the literature that demonstrates that food restriction decreases the accumulation of body fat (21, 23, 40) independent of the constitution of the basal diet being evaluated (41). Another important point to be observed is that the weight reduction of the adipose tissues may be associated with the hypertrophy process that took place, since there was a significant reduction in the diameter of adipocytes with the progressive increase in the values of food restriction, either under the treatment with a standard or high-fat diet (42, 43).

The results of insulin sensitivity and glucose tolerance tests showed beneficial results with the gradual increase of food restriction on standard and high-fat diets. Similar results were also found for the levels of fasting glucose. These results are in accordance with several published studies describing the beneficial effects of food restriction on glucose metabolism (20, 23, 40, 41). Regarding the lipid profile, reduced levels of total cholesterol, HDL-

cholesterol and triglycerides found with the gradual increase of food restriction corroborate with the results from other studies (41, 42). According to the “Consensus Statement of the Academy of Nutrition and Dietetics / American Society for Parenteral and Enteral Nutrition”, malnutrition may be related to low albumin plasma levels which was observed in both groups of mice treated with 60% of food restriction in both treatments (22).

Experimental studies suggest that the regulation of the RAS is influenced by the obesity degree (13). Therefore, weight reduction induced by food restriction may exert positive effects in RAS regulation. In this work, a decreased expression of AGT in epididymal adipose tissue with the gradual increase of food restriction of up to 40% of food intake baseline for standard and high-fat diets was evidenced. However, this reduction was not observed in the groups submitted to 60% food restriction, which on the contrary, revealed a significant increase in the expression of this gene when compared to the groups who had reduced food intake by 40% baseline. These results suggest that food restriction of up to 40% over the basal diet, regardless of whether standard or high-fat, are associated with improved regulation of the RAS, whereas values of 60% food restriction reflect negative effects in this regulation. The expression of ACE was reduced with increased food restriction in a similar way to AGT, but did not present significant increase in groups under food restriction of 60% when compared to the 40% groups, although these groups have shown the same tendency. These results are coherent with several studies that demonstrate that food restriction can beneficially regulate the RAS on controlling the rise of the plasma renin activity, angiotensinogen plasmatic levels and decrease of the ACE activity (12). There are a few studies that determine the maximum limit of food restriction that animals may be subjected without causing malnutrition, a study of longevity indicates that this limit stays between 55 and 60%, corroborating the results found in this study (23). The inflammatory markers expression of epididymal adipose tissue decreased with the increase in the food restriction

imposed on the animals, which was expected since the fatty tissue of animals decreased along with the food restriction increase.

Obesity has been described as a pro inflammatory state associated with increased circulating levels of inflammatory cytokines, such as IL- 6 and TNF - α (6, 7). Since the animals showed a decrease in body weight and adipose tissue (epididymal, retroperitoneal and mesenteric) with increased food restriction, a decreased expression of inflammatory markers was expected. However, restriction groups of 60% did not have this tendency, on the contrary, had significantly increased expression of inflammatory markers compared to the groups submitted to food restriction of 40% in both treatment groups. These results confirm the hypothesis that the benefits of food restriction increases with increased food restriction, but not indefinitely, and that values close to 60% of food restriction induce a state of malnutrition that is associated with increased expression of inflammatory markers, ACE and AGT as well as the obesity status (22, 23).

In conclusion, the present study shows that 20% and 40% food restriction prevents deterioration of glucose and lipid metabolic profile and controls the values of plasma albumin, body weight and the weight of epididymal, retroperitoneal, and mesenteric adipose tissues in mice subjected to standard and high-fat diets. 20% and 40% food restriction improved metabolism, controlling some of the RAS components and cytokines expression in mice, while a severe 60% food restriction (malnutrition) produced a new pro-inflammatory state with increased AGT and ACE expression similar to high-fat obese animals. These results support the food restriction use as a therapeutic alternative tool for the prevention of obesity-related disorders and modulation of RAS in adipose tissue.

PERSPECTIVES

Food restriction (20% and 40%) prevented body-weight gain and obesity, improving metabolic profile, besides controlling the expression of pro-inflammatory cytokines through

adipose tissue RAS modulation. Thus, these results confirm and extend previous results showing the food restriction relevance on preventing lipid and glucose disorders and opening perspectives for the use of RAS modulation to treat metabolic-related diseases.

DISCLOSURES

The authors have no conflicts to disclose.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) and Faculdades Integradas Pitágoras, Montes Claros (FIP-MOC), Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

REFERENCES

1. Jackson AW, Lee DC, Sui X, Morrow JR, Jr., Church TS, Maslow AL, et al. Muscular strength is inversely related to prevalence and incidence of obesity in adult men. *Obesity*. 2010 Oct;18(10):1988-95. PubMed PMID: 19960002.
2. de Ferranti S, Mozaffarian D. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clinical chemistry*. 2008 Jun;54(6):945-55. PubMed PMID: 18436717.
3. Hill JO, Melanson EL, Wyatt HT. Dietary fat intake and regulation of energy balance: implications for obesity. *The Journal of nutrition*. 2000 Feb;130(2S Suppl):284S-8S. PubMed PMID: 10721889.

4. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature reviews Immunology*. 2011 Feb;11(2):85-97. PubMed PMID: 21252989. Pubmed Central PMCID: 3518031.
5. Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet*. 2005 Oct 1;366(9492):1197-209. PubMed PMID: 16198769.
6. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006 Dec 14;444(7121):860-7. PubMed PMID: 17167474.
7. Engstrom G, Hedblad B, Stavenow L, Lind P, Janzon L, Lindgarde F. Inflammation-sensitive plasma proteins are associated with future weight gain. *Diabetes*. 2003 Aug;52(8):2097-101. PubMed PMID: 12882928.
8. Santos SH, Braga JF, Mario EG, Porto LC, Rodrigues-Machado Mda G, Murari A, et al. Improved lipid and glucose metabolism in transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1-7). *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010 May;30(5):953-61. PubMed PMID: 20203301.
9. Santos SH, Fernandes LR, Mario EG, Ferreira AV, Porto LC, Alvarez-Leite JI, et al. Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. *Diabetes*. 2008 Feb;57(2):340-7. PubMed PMID: 18025412.
10. Santos SH, Fernandes LR, Pereira CS, Guimaraes AL, de Paula AM, Campagnole-Santos MJ, et al. Increased circulating angiotensin-(1-7) protects white adipose tissue against development of a proinflammatory state stimulated by a high-fat diet. *Regulatory peptides*. 2012 Oct 10;178(1-3):64-70. PubMed PMID: 22749992.
11. Massiera F, Seydoux J, Geloën A, Quignard-Boulangé A, Turban S, Saint-Marc P, et al. Angiotensinogen-deficient mice exhibit impairment of diet-induced weight gain with alteration in adipose tissue development and increased locomotor activity. *Endocrinology*. 2001 Dec;142(12):5220-5. PubMed PMID: 11713218.

12. Engeli S, Negrel R, Sharma AM. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension*. 2000 Jun;35(6):1270-7. PubMed PMID: 10856276.
13. Shinozaki K, Ayajiki K, Nishio Y, Sugaya T, Kashiwagi A, Okamura T. Evidence for a causal role of the renin-angiotensin system in vascular dysfunction associated with insulin resistance. *Hypertension*. 2004 Feb;43(2):255-62. PubMed PMID: 14698997.
14. Engeli S, Schling P, Gorzelniak K, Boschmann M, Janke J, Ailhaud G, et al. The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2003 Jun;35(6):807-25. PubMed PMID: 12676168.
15. Blaj S, Stanciu S, Jurcut C, Ciobica L. Hypertension in obese patients: a dysmetabolic hypertension with a possible adipocyte dysfunction mechanism. *Romanian journal of internal medicine = Revue roumaine de medecine interne*. 2003;41(2):103-11. PubMed PMID: 15526495.
16. Weindruch R, Walford RL. The Retardation of Aging and Disease by Dietary restriction. *Journal of nutrition*. 1990;120:1139.
17. Weindruch R, Sohal RS. Caloric Intake and Aging. *N Engl J Med*. 1997;337:986-94.
18. Mattson MP. Energy intake, meal frequency, and health: a neurobiological perspective. *Annual review of nutrition*. 2005;25:237-60. PubMed PMID: 16011467.
19. Ramsey JJ, Colman RJ, Binkley NC, Christensen JD, Gresl TA, Kemnitz JW, et al. Dietary restriction and aging in rhesus monkeys: the University of Wisconsin study. *Experimental gerontology*. 2000 Dec;35(9-10):1131-49. PubMed PMID: 11113597.
20. Kemnitz JW, Roecker EB, Weindruch R, Elson DF, Baum ST, Bergman RN. Dietary restriction increases insulin sensitivity and lowers blood glucose in rhesus monkeys. *The American journal of physiology*. 1994 Apr;266(4 Pt 1):E540-7. PubMed PMID: 8178974.

21. Lane MA, Ingram DK, Roth GS. Calorie restriction in nonhuman primates: effects on diabetes and cardiovascular disease risk. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 1999 Dec;52(2 Suppl):41-8. PubMed PMID: 10630589.
22. White JV, Guenter P, Jensen G, Malone A, Schofield M, Academy of N, et al. Consensus statement of the Academy of Nutrition and Dietetics/American Society for Parenteral and Enteral Nutrition: characteristics recommended for the identification and documentation of adult malnutrition (undernutrition). *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 2012 May;112(5):730-8. PubMed PMID: 22709779.
23. Speakman JR, Mitchell SE. Caloric restriction. *Molecular aspects of medicine*. 2011 Jun;32(3):159-221. PubMed PMID: 21840335.
24. Wise JK. Employment, starting salaries, and educational indebtedness of 1990 graduates of US veterinary medical colleges. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1990 Nov 15;197(10):1381-2. PubMed PMID: 2266061.
25. Santos RA, Ferreira AJ, Nadu AP, Braga AN, de Almeida AP, Campagnole-Santos MJ, et al. Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. *Physiological genomics*. 2004 May 19;17(3):292-9. PubMed PMID: 15039487.
26. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. PubMed PMID: 11846609.
27. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation research*. 2000 Sep 1;87(5):E1-9. PubMed PMID: 10969042.
28. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-

insensitive carboxypeptidase. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Oct 27;275(43):33238-43. PubMed PMID: 10924499.

29. Putnam K, Shoemaker R, Yiannikouris F, Cassis LA. The renin-angiotensin system: a target of and contributor to dyslipidemias, altered glucose homeostasis, and hypertension of the metabolic syndrome. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2012 Mar 15;302(6):H1219-30. PubMed PMID: 22227126. Pubmed Central PMCID: 3311482.

30. Simoes ESAC, Flynn JT. The renin-angiotensin-aldosterone system in 2011: role in hypertension and chronic kidney disease. *Pediatric nephrology*. 2012 Oct;27(10):1835-45. PubMed PMID: 21947887.

31. Ribeiro-Oliveira A, Jr., Nogueira AI, Pereira RM, Boas WW, Dos Santos RA, Simoes e Silva AC. The renin-angiotensin system and diabetes: an update. *Vascular health and risk management*. 2008;4(4):787-803. PubMed PMID: 19065996. Pubmed Central PMCID: 2597759.

32. Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003 Jul 8;100(14):8258-63. PubMed PMID: 12829792. Pubmed Central PMCID: 166216.

33. Mario EG, Santos SH, Ferreira AV, Bader M, Santos RA, Botion LM. Angiotensin-(1-7) Mas-receptor deficiency decreases peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in adipocytes. *Peptides*. 2012 Jan;33(1):174-7. PubMed PMID: 22119778.

34. Liu C, Lv XH, Li HX, Cao X, Zhang F, Wang L, et al. Angiotensin-(1-7) suppresses oxidative stress and improves glucose uptake via Mas receptor in adipocytes. *Acta diabetologica*. 2012 Aug;49(4):291-9. PubMed PMID: 22042130.

35. Feltenberger JD, Andrade JM, Paraiso A, Barros LO, Filho AB, Sinisterra RD, et al. Oral formulation of angiotensin-(1-7) improves lipid metabolism and prevents high-fat diet-induced hepatic steatosis and inflammation in mice. *Hypertension*. 2013 Aug;62(2):324-30. PubMed PMID: 23753417.
36. Fraga-Silva RA, Ferreira AJ, Dos Santos RA. Opportunities for targeting the angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/mas receptor pathway in hypertension. *Current hypertension reports*. 2013 Feb;15(1):31-8. PubMed PMID: 23212695.
37. Zimmerman MA, Harris RA, Sullivan JC. Female spontaneously hypertensive rats are more dependent on ANG (1-7) to mediate effects of low-dose AT1 receptor blockade than males. *American journal of physiology Renal physiology*. 2014 May 15;306(10):F1136-42. PubMed PMID: 24647710. Pubmed Central PMCID: 4024730.
38. Souza AP, Sobrinho DB, Almeida JF, Alves GM, Macedo LM, Porto JE, et al. Angiotensin II type 1 receptor blockade restores angiotensin-(1-7)-induced coronary vasodilation in hypertrophic rat hearts. *Clinical science*. 2013 Nov;125(9):449-59. PubMed PMID: 23718715.
39. Sharp S, Poglitsch M, Zilla P, Davies NH, Sturrock ED. Pharmacodynamic effects of C-domain-specific ACE inhibitors on the renin-angiotensin system in myocardial infarcted rats. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS*. 2015 Mar 9. PubMed PMID: 25757657.
40. Moura LP, Figueredo GA, Bertolini NO, Ceccato M, Pereira JR, Sponton AC, et al. Dietary restriction, caloric value and the accumulation of hepatic fat. *Lipids in health and disease*. 2012;11:2. PubMed PMID: 22221448. Pubmed Central PMCID: 3276414.
41. Kirchner H, Hofmann SM, Fischer-Rosinsky A, Hembree J, Abplanalp W, Ottaway N, et al. Caloric restriction chronically impairs metabolic programming in mice. *Diabetes*. 2012 Nov;61(11):2734-42. PubMed PMID: 22787140. Pubmed Central PMCID: 3478536.

42. Lijnen HR, Van Hul M, Hemmeryckx B. Caloric restriction improves coagulation and inflammation profile in obese mice. *Thrombosis research*. 2012 Jan;129(1):74-9. PubMed PMID: 21689844.
43. Chujo Y, Fujii N, Okita N, Konishi T, Narita T, Yamada A, et al. Caloric restriction-associated remodeling of rat white adipose tissue: effects on the growth hormone/insulin-like growth factor-1 axis, sterol regulatory element binding protein-1, and macrophage infiltration. *Age*. 2013 Aug;35(4):1143-56. PubMed PMID: 22645024. Pubmed Central PMCID: 3705091.

NOVELTY AND SIGNIFICANCE:

1) What Is New: The present study shows for the first time that 20% and 40% food restriction improves metabolism controlling the proinflammatory cytokines and RAS expression in mice, while a severe 60% food restriction produce a new pro-inflammatory profile with increased AGT and ACE expression.

2) What Is Relevant? The presented results are extremely relevant because they describe that food restriction value is associated with beneficial effects on the metabolic profile before inducing a malnutrition state and RAS is modulated accordingly.

3) Summary: In summary, we showed that food restriction prevents alterations of glucose and lipid metabolism and controls the values of plasma albumin, body weight and the weight of epididymal, retroperitoneal, and mesenteric adipose tissues in mice subjected to increased amounts of food restriction on standard and high-fat diets. It is also concluded that 20% and 40% of food restriction control the proinflammatory cytokines expression in mice, while a severe 60% food restriction produce a new pro-inflammatory profile with increased AGT and ACE fat expression.

FIGURES AND LEGENDS

	ST	ST-20%FR	ST-40%FR	ST-60%FR
Glucose (mg/dL)	133.6 ± 27.6	81.4 ± 18.2***	62.8 ± 19.12 ***	35.71 ± 17.2***
Total cholesterol (mg/dL)	110.0 ± 11.7	100.0 ± 9.3	95.8 ± 14.3	82.1 ± 23.2*
High-density lipoprotein (mg/dL)	76.0 ± 12.9	67.8 ± 5.9	64.4 ± 7.4	60.15 ± 6.9 *
Triglycerides (mg/dL)	113.0 ± 8.8	82.8 ± 14.7**	62.1 ± 22.2 ***	49.29 ± 19.7***
Albumin (g/dL)	5.5 ± 0.6	5.7 ± 0.3	5.5 ± 0.3	4.6 ± 0.4*

Table 1 – Plasma glucose, lipidic parameters and albumin in mice subjected to food restriction standard diet (ST, ST-20%FR, ST-40%FR, ST-60%FR). Data are presented as mean ± SEM; * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001. * Between treatment groups (ST-20%FR, ST-40%FR, ST-60%FR) and ST.

	ST	HFD	HFD-20%FR	HFD-40%FR	HFD-60%FR
Glucose (mg/dL)	133.6 ± 27.6	163.9 ± 40.9	101.5 ± 30.2***	94.5 ± 23.7***	45.0 ± 15.1***
Total cholesterol (mg/dL)	110.0 ± 11.7	137.5 ± 24.4	111.8 ± 37.1	89.4 ± 12.7 **	83.1 ± 17.7**
High-density lipoprotein (mg/dL)	76.0 ± 12.9	87.0 ± 17.2	76.8 ± 8.4	74.2 ± 8.2	69.4 ± 9.9 *
Triglycerides (mg/dL)	113.0 ± 8.8	118.3 ± 27.8	111.9 ± 32.7	94.2 ± 9.3	75.2 ± 16.4**
Albumin (g/dL)	5.5 ± 0.6	5.8 ± 0.2	5.6 ± 0.1	5.5 ± 0.2	5.1 ± 0.3 ***

Table 2 – Plasma glucose, lipidic parameters and albumin in mice subjected to food restriction high-fat diet (HFD, HFD-20%FR, HFD-40%FR, HFD-60%FR). Data are presented as mean ± SEM; * p<0.05, ** p<0.01; *** p<0.001. * Between treatment groups (HFD-20%FR; HFD-40%FR; HFD-60%FR) and HFD.

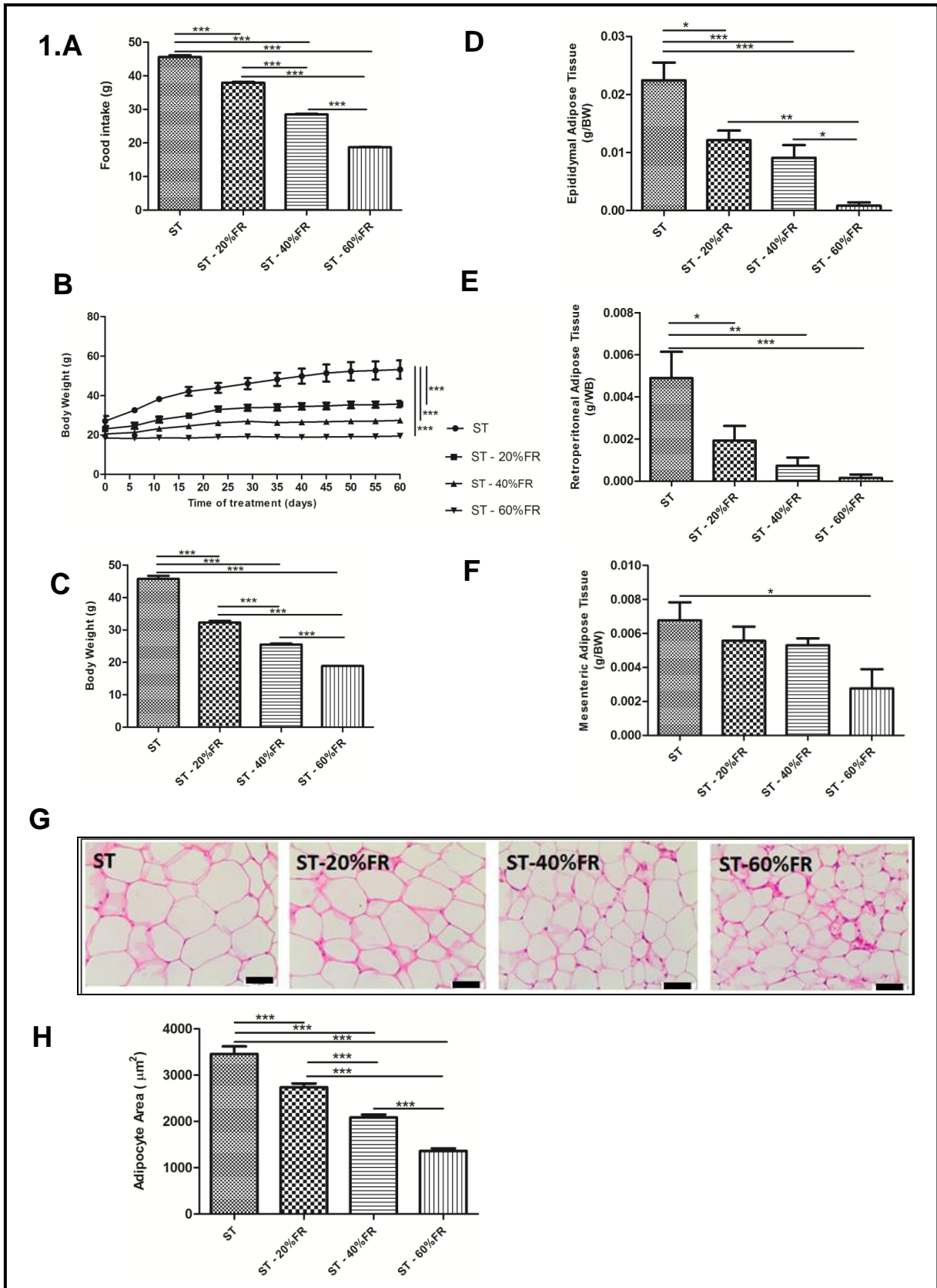


Fig. 1. Food intake, body weight, fat weight, adipocyte area and hematoxylin/eosin staining in mice subjected to food restriction standard diet (ST, ST-20%FR, ST-40%FR and ST-60%FR). Food intake (A), daily body weight (B), total body weight (C), epididymal adipose tissue weight (D), retroperitoneal adipose tissue weight (E), mesenteric adipose tissue weight (F), hematoxylin and eosin staining (G) and epididymal adipocyte area (H). Scale bar indicates 50 μm (G). Data are presented as mean \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

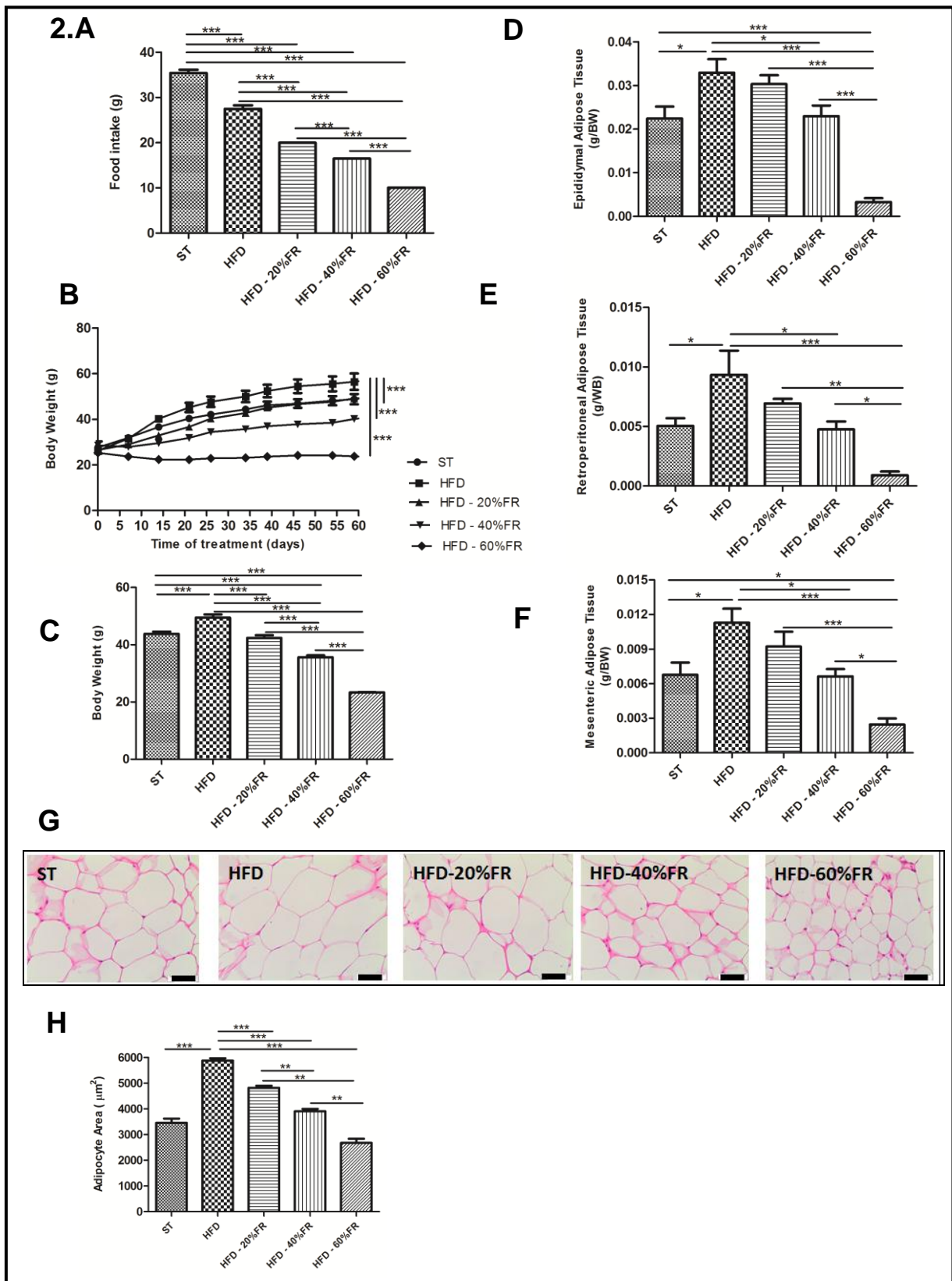


Fig. 2. Food intake, body weight, fat weight, adipocyte area and hematoxylin/eosin staining in mice subjected to food restriction high fat diet (ST, HFD, HFD-20%FR, HFD-40%FR, HFD-60%FR). Food intake (A), daily body weight (B), total body weight (C), epididymal adipose tissue weight (D), retroperitoneal adipose tissue weight (E), mesenteric adipose tissue weight (F), hematoxylin and eosin staining (G) and epididymal adipocyte area (H). Scale bar indicates 50 μm (G). Data are presented as mean \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

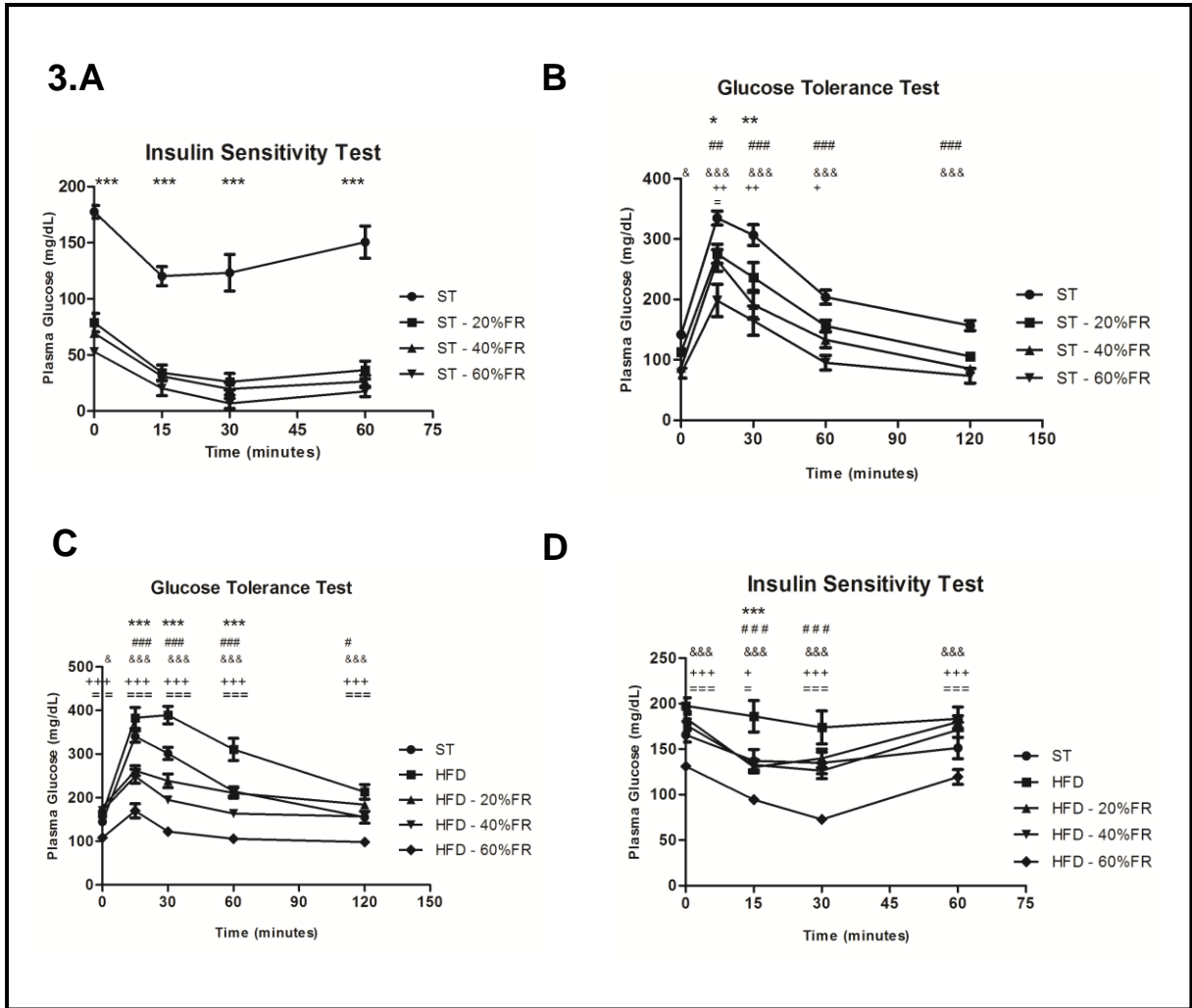


Fig. 3. Insulin sensitivity and glucose tolerance tests in mice subjected to food restriction standard (Fig. A and B) and high-fat (Fig. C and D) diets. Data are presented as mean \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Fig. A: * Between treatment groups (ST-20%FR, ST-40%FR, ST-60%FR) and ST. Fig. B: * Between ST e ST+20%FR; # entre ST e ST-40%FR, & entre ST e ST-60%FR, + entre ST-20%FR e ST-60%FR; = entre ST-40%FR e ST-60%FR. Fig. C and D: * Between HFD e HFD-20%FR; # entre HFD e HFD-40%FR, & entre HFD e HFD-60%FR, + entre HFD-20%FR e HFD-60%FR; = entre HFD-40%FR e HFD-60%FR. The symbols # & += has the same statistical value *.

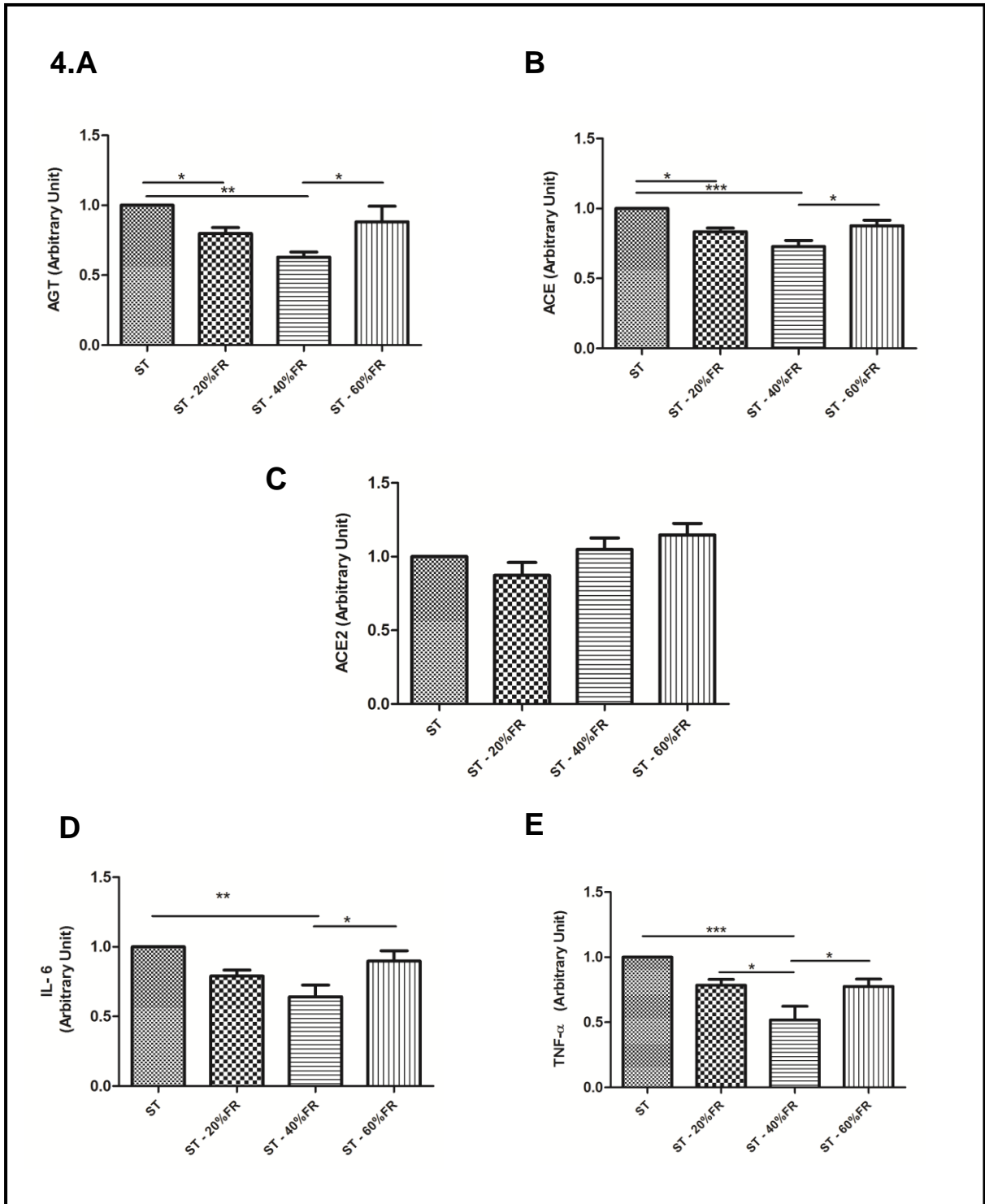


Fig. 4. Effects of 8-week food restriction on gene expression levels components of the renin-angiotensin and inflammatory markers epididymal adipose tissue of mice fed a standard diet (A-E). AGT (A), ACE (B), ACE2 (C), IL-6 (D) e TNF- α (E). Data are presented as mean \pm SEM; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

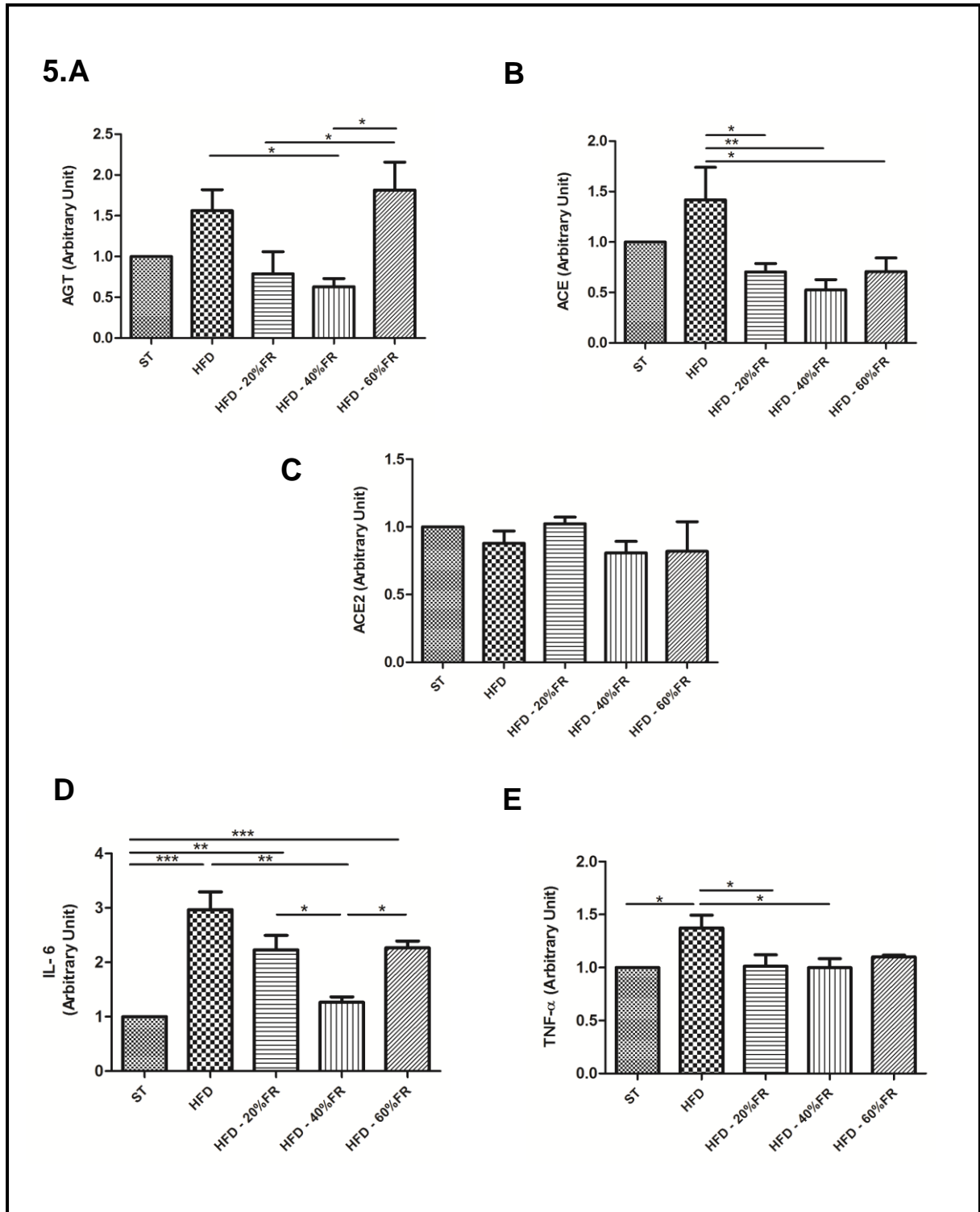


Fig. 5. Effects of 8-week food restriction on gene expression levels components of the renin-angiotensin and inflammatory markers epididymal adipose tissue of mice fed high-fat diet (A-E). AGT (A), ACE (B), ACE2 (C), IL-6 (D) e TNF- α (E). Data are presented as mean \pm SEM; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em síntese, os resultados do presente trabalho mostraram que a restrição alimentar em camundongos Swiss tratados com dietas normolipídica e hiperlipídica reduz o peso corporal, melhora o metabolismo glicêmico e lipídico, reduz a albumina plasmática, diminui o peso dos tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e mesentérico e reduz área dos adipócitos no tecido adiposo epididimal. Verificou-se ainda diminuição da expressão de IL-6, TNF- α , AGT e ECA nos grupos de tratamento de 20% e 40%, e um aumento da expressão nos grupos de restrição alimentar de 60%. Esses resultados sugerem que restrição alimentar de 20% e 40% melhora o metabolismo, controla a expressão do SRA e de citocinas inflamatórias em camundongos, enquanto que uma severa restrição alimentar de 60% produz um novo perfil pró-inflamatório com aumento das expressões de AGT e ECA.

Em conjunto, esses achados sugerem que a restrição alimentar é uma importante ferramenta na prevenção e tratamento de doenças associadas ao metabolismo, sobretudo no quadro de síndrome metabólica.

REFERÊNCIAS

1. Das M, Gabriely I, Barzilai N. Caloric restriction, body fat and ageing in experimental models. *Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2004 Feb;5(1):13-9. PubMed PMID: 14969503.
2. Pozzan R, Pozzan R, Magalhães MEC, Brandão AA, Brandão AP. Dislipidemia, síndrome metabólica e risco cardiovascular. *RSOCERJ* 2004; 17(2): 97-104.
3. Mendonça CP, Anjos LA. Aspectos das práticas alimentares e da atividade física como determinantes do crescimento do sobrepeso/obesidade no Brasil. *Cad Saúde Pública* 2004; 20(3): 698-709.
4. Kassi E, Pervanidou P, Kaltsas G, Chrousos G. Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC medicine*. 2011;9:48. PubMed PMID: 21542944. Pubmed Central PMCID: 3115896.
5. Hill JO, Melanson EL, Wyatt HT. Dietary fat intake and regulation of energy balance: implications for obesity. *The Journal of nutrition*. 2000 Feb;130(2S Suppl):284S-8S. PubMed PMID: 10721889.
6. Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet*. 2005 Oct 1;366(9492):1197-209. PubMed PMID: 16198769.
7. Rodgers RJ, Tschop MH, Wilding JP. Anti-obesity drugs: past, present and future. *Disease models & mechanisms*. 2012 Sep;5(5):621-6. PubMed PMID: 22915024. Pubmed Central PMCID: 3424459.
8. Guh DP, Zhang W, Bansback N, Amarsi Z, Birmingham CL, Anis AH. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC public health*. 2009;9:88. PubMed PMID: 19320986. Pubmed Central PMCID: 2667420.
9. Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *International journal of obesity*. 2008 Sep;32(9):1431-7. PubMed PMID: 18607383.
10. Adams KF, Schatzkin A, Harris TB, Kipnis V, Mouw T, Ballard-Barbash R, et al. Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *The New England journal of medicine*. 2006 Aug 24;355(8):763-78. PubMed PMID: 16926275.
11. World Health Organization 2011. Noncommunicable diseases. Chronic diseases and health promotion. WHO Global InfoBase. Int'l Comparisons: Global Comparable Estimates, Risk Factors. body mass index: mean BMI (kg/m²). Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2011.
12. Brasil. *Vigitel Brasil 2010: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas*

- por inquérito telefônico/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. Ministério da Saúde. Brasília, 2011.
13. Brasil. Vigitel Brasil 2014: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. Ministério da Saúde. Brasília, 2014.
 14. Tenenbaum A, Fisman EZ. "The metabolic syndrome... is dead": these reports are an exaggeration. *Cardiovascular diabetology*. 2011;10:11. PubMed PMID: 21269524. Pubmed Central PMCID: 3036609.
 15. Cornier, M.A.; Dabelea, D.; Hernandez ,T.L.; Lindstrom, R.C.; Steig, A.J.; Stob N.R.; Van Pelt, R.E.; Wang, H.; Eckel, R.H. The metabolic syndrome. *Endocr Rev.*, v.29, p.777-822, 2008.
 16. Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Jama*. 2002 Jan 16;287(3):356-9. PubMed PMID: 11790215.
 17. Costa LA, Canani LH, Lisboa HR, Tres GS, Gross JL. Aggregation of features of the metabolic syndrome is associated with increased prevalence of chronic complications in Type 2 diabetes. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2004 Mar;21(3):252-5. PubMed PMID: 15008835.
 18. Grundy SM, Brewer HB, Jr., Cleeman JI, Smith SC, Jr., Lenfant C, American Heart A, et al. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*. 2004 Jan 27;109(3):433-8. PubMed PMID: 14744958.
 19. Grundy SM, Brewer HB, Jr., Cleeman JI, Smith SC, Jr., Lenfant C, National Heart L, et al. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004 Feb;24(2):e13-8. PubMed PMID: 14766739.
 20. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association*. 1998 Jul;15(7):539-53. PubMed PMID: 9686693.
 21. Zimmet P, Magliano D, Matsuzawa Y, Alberti G, Shaw J. The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2005;12(6):295-300. PubMed PMID: 16394610.
 22. Ramsey JJ, Colman RJ, Binkley NC, Christensen JD, Gresl TA, Kemnitz JW, et al. Dietary restriction and aging in rhesus monkeys: the University of Wisconsin study. *Experimental gerontology*. 2000 Dec;35(9-10):1131-49. PubMed PMID: 11113597.
 23. Mottillo S, Fillion KB, Genest J, Joseph L, Pilote L, Poirier P, et al. The metabolic syndrome and cardiovascular risk a systematic review and meta-analysis. *Journal of the*

- American College of Cardiology. 2010 Sep 28;56(14):1113-32. PubMed PMID: 20863953.
24. Wree A, Kahraman A, Gerken G, Canbay A. Obesity affects the liver - the link between adipocytes and hepatocytes. *Digestion*. 2011;83(1-2):124-33. PubMed PMID: 21042023.
 25. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006 Dec 14;444(7121):860-7. PubMed PMID: 17167474.
 26. Miranda PJ, DeFronzo RA, Califf RM, Guyton JR. Metabolic syndrome: definition, pathophysiology, and mechanisms. *American heart journal*. 2005 Jan;149(1):33-45. PubMed PMID: 15660032.
 27. Dowman JK, Armstrong MJ, Tomlinson JW, Newsome PN. Current therapeutic strategies in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2011 Aug;13(8):692-702. PubMed PMID: 21449949.
 28. Khashab MA, Liangpunsakul S, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease as a component of the metabolic syndrome. *Current gastroenterology reports*. 2008 Feb;10(1):73-80. PubMed PMID: 18417046.
 29. McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935. *Nutrition*. 1989 May-Jun;5(3):155-71; discussion 72. PubMed PMID: 2520283.
 30. Koubova J, Guarente L. How does calorie restriction work? *Genes & development*. 2003 Feb 1;17(3):313-21. PubMed PMID: 12569120.
 31. Weindruch R, Walford RL. The Retardation of Aging and Disease by Dietary restriction. *Journal of nutrition*. 1990;120:1139.
 32. Weindruch R, Sohal RS. Caloric Intake and Aging. *N Engl J Med*. 1997;337:986-94.
 33. Mattson MP. Energy intake, meal frequency, and health: a neurobiological perspective. *Annual review of nutrition*. 2005;25:237-60. PubMed PMID: 16011467.
 34. Guo Z, Mitchell-Raymundo F, Yang H, Ikeno Y, Nelson J, Diaz V, et al. Dietary restriction reduces atherosclerosis and oxidative stress in the aorta of apolipoprotein E-deficient mice. *Mechanisms of ageing and development*. 2002 Apr 30;123(8):1121-31. PubMed PMID: 12044962.
 35. Hursting SD, Lavigne JA, Berrigan D, Perkins SN, Barrett JC. Calorie restriction, aging, and cancer prevention: mechanisms of action and applicability to humans. *Annual review of medicine*. 2003;54:131-52. PubMed PMID: 12525670.
 36. Ingram DK, Cutler RG, Weindruch R, Renquist DM, Knapka JJ, April M, et al. Dietary restriction and aging: the initiation of a primate study. *Journal of gerontology*. 1990 Sep;45(5):B148-63. PubMed PMID: 2394908.
 37. Kemnitz JW, Roecker EB, Weindruch R, Elson DF, Baum ST, Bergman RN. Dietary

- restriction increases insulin sensitivity and lowers blood glucose in rhesus monkeys. *The American journal of physiology*. 1994 Apr;266(4 Pt 1):E540-7. PubMed PMID: 8178974.
38. Gresl TA, Colman RJ, Roecker EB, Havighurst TC, Huang Z, Allison DB, et al. Dietary restriction and glucose regulation in aging rhesus monkeys: a follow-up report at 8.5 yr. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2001 Oct;281(4):E757-65. PubMed PMID: 11551852.
 39. Keys, A.; Brozek, J.; Henschels, A.; Mickelsen, O.; Taylor, H. *The Biology of Human Starvation*. Minneapolis: University of Minnesota Press, V.2. 1950.
 40. Matsuzaki J, Kuwamura M, Yamaji R, Inui H, Nakano Y. Inflammatory responses to lipopolysaccharide are suppressed in 40% energy-restricted mice. *The Journal of nutrition*. 2001 Aug;131(8):2139-44. PubMed PMID: 11481408.
 41. Ershler WB, Sun WH, Binkley N, Gravenstein S, Volk MJ, Kamoske G, et al. Interleukin-6 and aging: blood levels and mononuclear cell production increase with advancing age and in vitro production is modifiable by dietary restriction. *Lymphokine and cytokine research*. 1993 Aug;12(4):225-30. PubMed PMID: 8218595.
 42. Han ES, Evans TR, Shu JH, Lee S, Nelson JF. Food restriction enhances endogenous and corticotropin-induced plasma elevations of free but not total corticosterone throughout life in rats. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2001 Sep;56(9):B391-7. PubMed PMID: 11524440.
 43. Sabatino F, Masoro EJ, McMahan CA, Kuhn RW. Assessment of the role of the glucocorticoid system in aging processes and in the action of food restriction. *Journal of gerontology*. 1991 Sep;46(5):B171-9. PubMed PMID: 1890278.
 44. Spaulding CC, Walford RL, Effros RB. Calorie restriction inhibits the age-related dysregulation of the cytokines TNF-alpha and IL-6 in C3B10RF1 mice. *Mechanisms of aging and development*. 1997 Feb;93(1-3):87-94. PubMed PMID: 9089573.
 45. Holloszy JO. The biology of aging. *Mayo Clinic proceedings*. 2000 Jan;75 Suppl:S3-8; discussion S-9. PubMed PMID: 10959208.
 46. Gonzalez AA, Kumar R, Mulligan JD, Davis AJ, Weindruch R, Saupe KW. Metabolic adaptations to fasting and chronic caloric restriction in heart, muscle, and liver do not include changes in AMPK activity. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2004 Nov;287(5):E1032-7. PubMed PMID: 15251868.
 47. Lane MA, Ingram DK, Roth GS. Calorie restriction in nonhuman primates: effects on diabetes and cardiovascular disease risk. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 1999 Dec;52(2 Suppl):41-8. PubMed PMID: 10630589.
 48. White JV, Guenter P, Jensen G, Malone A, Schofield M, Academy of N, et al. Consensus statement of the Academy of Nutrition and Dietetics/American Society for Parenteral and Enteral Nutrition: characteristics recommended for the identification and documentation of adult malnutrition (undernutrition). *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 2012 May;112(5):730-8. PubMed PMID: 22709779.

49. Speakman JR, Mitchell SE. Caloric restriction. *Molecular aspects of medicine*. 2011 Jun;32(3):159-221. PubMed PMID: 21840335.
50. Engstrom G, Hedblad B, Stavenow L, Lind P, Janzon L, Lindgarde F. Inflammation-sensitive plasma proteins are associated with future weight gain. *Diabetes*. 2003 Aug;52(8):2097-101. PubMed PMID: 12882928.
51. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature reviews Immunology*. 2011 Feb;11(2):85-97. PubMed PMID: 21252989. Pubmed Central PMCID: 3518031.
52. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004 Jun;89(6):2548-56. PubMed PMID: 15181022.
53. Vazquez-Vela ME, Torres N, Tovar AR. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Archives of medical research*. 2008 Nov;39(8):715-28. PubMed PMID: 18996284.
54. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 2003 Dec;112(12):1821-30. PubMed PMID: 14679177. Pubmed Central PMCID: 296998.
55. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*. 2003 Dec;112(12):1796-808. PubMed PMID: 14679176. Pubmed Central PMCID: 296995.
56. Canello R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Poitou C, Rouault C, et al. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes*. 2005 Aug;54(8):2277-86. PubMed PMID: 16046292.
57. Bruun JM, Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005 Apr;90(4):2282-9. PubMed PMID: 15671098.
58. Dorland's Illustrated Medical Dictionary, 32nd edition. New York, NY: Elsevier Health Sciences Division; 2011.
59. Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age and Ageing*. 2010;39(4):412-423. doi:10.1093/ageing/afq034.
60. Jensen GL, Mirtallo J, Compher C, Dhaliwal R, Forbes A, Grijalba RF, et al. Adult starvation and disease-related malnutrition: a proposal for etiology-based diagnosis in the clinical practice setting from the International Consensus Guideline Committee. *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition*. 2010 Mar-Apr;34(2):156-9. PubMed PMID:

20375423.



61. Engeli S, Negrel R, Sharma AM. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension*. 2000 Jun;35(6):1270-7. PubMed PMID: 10856276.
62. Santos RA, Ferreira AJ. Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2007 Mar;16(2):122-8. PubMed PMID: 17293687.
63. Hainault I, Nebout G, Turban S, Ardouin B, Ferre P, Quignard-Boulangé A. Adipose tissue-specific increase in angiotensinogen expression and secretion in the obese (fa/fa) Zucker rat. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2002 Jan;282(1):E59-66. PubMed PMID: 11739084.
64. Batenburg WW, Garrelds IM, Bernasconi CC, Juillerat-Jeanneret L, van Kats JP, Saxena PR, et al. Angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation in human coronary microarteries. *Circulation*. 2004 May 18;109(19):2296-301. PubMed PMID: 15117835.
65. Cheng ZJ, Vapaatalo H, Mervaala E. Angiotensin II and vascular inflammation. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2005 Jun;11(6):RA194-205. PubMed PMID: 15917731.
66. Giacchetti G, Sechi LA, Rilli S, Carey RM. The renin-angiotensin-aldosterone system, glucose metabolism and diabetes. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2005 Apr;16(3):120-6. PubMed PMID: 15808810.
67. Singh BM, Mehta JL. Interactions between the renin-angiotensin system and dyslipidemia: relevance in the therapy of hypertension and coronary heart disease. *Archives of internal medicine*. 2003 Jun 9;163(11):1296-304. PubMed PMID: 12796065.
68. Kucharewicz I, Chabielska E, Pawlak D, Matys T, Rolkowski R, Buczek W. The antithrombotic effect of angiotensin-(1-7) closely resembles that of losartan. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS*. 2000 Sep;1(3):268-72. PubMed PMID: 11881036.
69. Rajendran S, Chirkov YY, Campbell DJ, Horowitz JD. Angiotensin-(1-7) enhances anti-aggregatory effects of the nitric oxide donor sodium nitroprusside. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2005 Oct;46(4):459-63. PubMed PMID: 16160597.
70. Lemos VS, Côrtes SF, Silva DMR, Campagnole-Santos MJ, Santos RAS. Angiotensin-(1-7) is involved in the endothelium-dependent modulation of phenylephrine-induced contraction in the aorta of mRen-2 transgenic rats. *British Journal of Pharmacology*. 2002;135(7):1743-1748.
71. Clark MA, Diz DI, Tallant EA. Angiotensin-(1-7) downregulates the angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 2001 Apr;37(4):1141-6. PubMed PMID: 11304516.
72. Deddish PA, Marcic B, Jackman HL, Wang HZ, Skidgel RA, Erdos EG. N-domain-

- specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and keto-ACE. *Hypertension*. 1998 Apr;31(4):912-7. PubMed PMID: 9535414.
73. Welches WR, Santos RA, Chappell MC, Brosnihan KB, Greene LJ, Ferrario CM. Evidence that prolyl endopeptidase participates in the processing of brain angiotensin. *Journal of hypertension*. 1991 Jul;9(7):631-8. PubMed PMID: 1653799.
74. Yamamoto K, Chappell MC, Brosnihan KB, Ferrario CM. In vivo metabolism of angiotensin I by neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1992 Jun;19(6 Pt 2):692-6. PubMed PMID: 1317352.
75. Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DI. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension*. 1997 Sep;30(3 Pt 2):535-41. PubMed PMID: 9322978.
76. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation research*. 2000 Sep 1;87(5):E1-9. PubMed PMID: 10969042.
77. Santos RA, Simoes e Silva AC, Magaldi AJ, Khosla MC, Cesar KR, Passaglio KT, et al. Evidence for a physiological role of angiotensin-(1-7) in the control of hydroelectrolyte balance. *Hypertension*. 1996 Apr;27(4):875-84. PubMed PMID: 8613263.
78. Yamada K, Iyer SN, Chappell MC, Ganten D, Ferrario CM. Converting enzyme determines plasma clearance of angiotensin-(1-7). *Hypertension*. 1998 Sep;32(3):496-502. PubMed PMID: 9740616.
79. Ferrario CM, Barnes KL, Block CH, Brosnihan KB, Diz DI, Khosla MC, et al. Pathways of angiotensin formation and function in the brain. *Hypertension*. 1990 Feb;15(2 Suppl):I13-9. PubMed PMID: 2404855.
80. Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin-(1-7): an update. *Regulatory peptides*. 2000 Jul 28;91(1-3):45-62. PubMed PMID: 10967201.
81. Santos RA, Ferreira AJ, Simoes ESAC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Experimental physiology*. 2008 May;93(5):519-27. PubMed PMID: 18310257.
82. Fraga-Silva RA, Ferreira AJ, Dos Santos RA. Opportunities for targeting the angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/mas receptor pathway in hypertension. *Current hypertension reports*. 2013 Feb;15(1):31-8. PubMed PMID: 23212695.
83. Zimmerman MA, Harris RA, Sullivan JC. Female spontaneously hypertensive rats are more dependent on ANG (1-7) to mediate effects of low-dose AT1 receptor blockade than males. *American journal of physiology Renal physiology*. 2014 May 15;306(10):F1136-42. PubMed PMID: 24647710. Pubmed Central PMCID: 4024730.
84. Souza AP, Sobrinho DB, Almeida JF, Alves GM, Macedo LM, Porto JE, et al.

- Angiotensin II type 1 receptor blockade restores angiotensin-(1-7)-induced coronary vasodilation in hypertrophic rat hearts. *Clinical science*. 2013 Nov;125(9):449-59. PubMed PMID: 23718715.
85. Sharp S, Poglitsch M, Zilla P, Davies NH, Sturrock ED. Pharmacodynamic effects of C-domain-specific ACE inhibitors on the renin-angiotensin system in myocardial infarcted rats. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS*. 2015 Mar 9. PubMed PMID: 25757657.
 86. Notsu K, Oka N, Masaki Y, Furuya H, Kato Y. Plasma free triiodothyronine response to thyrotropin-releasing hormone to predict the remission of Graves' disease treated with antithyroid drugs. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1991 Aug;73(2):396-400. PubMed PMID: 1713218.
 87. Harp JB, DiGirolamo M. Components of the renin-angiotensin system in adipose tissue: changes with maturation and adipose mass enlargement. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 1995 Sep;50(5):B270-6. PubMed PMID: 7671018.
 88. Safonova I, Aubert J, Negrel R, Ailhaud G. Regulation by fatty acids of angiotensinogen gene expression in preadipose cells. *Biochemical Journal*. 1997;322(Pt 1):235-239.
 89. Cassis L, Laughter A, Fettinger M, Akers S, Speth R, Burke G, et al. Cold exposure regulates the renin-angiotensin system. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1998 Aug;286(2):718-26. PubMed PMID: 9694926.
 90. Prasad A, Quyyumi AA. Renin-angiotensin system and angiotensin receptor blockers in the metabolic syndrome. *Circulation*. 2004 Sep 14;110(11):1507-12. PubMed PMID: 15364819.
 91. Shinozaki K, Ayajiki K, Nishio Y, Sugaya T, Kashiwagi A, Okamura T. Evidence for a causal role of the renin-angiotensin system in vascular dysfunction associated with insulin resistance. *Hypertension*. 2004 Feb;43(2):255-62. PubMed PMID: 14698997.
 92. Cooper D, Stokes KY, Tailor A, Granger DN. Oxidative stress promotes blood cell-endothelial cell interactions in the microcirculation. *Cardiovascular toxicology*. 2002;2(3):165-80. PubMed PMID: 12665663.
 93. Engeli S, Schling P, Gorzelniak K, Boschmann M, Janke J, Ailhaud G, et al. The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2003 Jun;35(6):807-25. PubMed PMID: 12676168.
 94. Blaj S, Stanciu S, Jurcut C, Ciobica L. Hypertension in obese patients: a dysmetabolic hypertension with a possible adipocyte dysfunction mechanism. *Romanian journal of internal medicine = Revue roumaine de medecine interne*. 2003;41(2):103-11. PubMed PMID: 15526495.

ANEXO

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Experimentação e Bem Estar Animal.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO E BEM-ESTAR ANIMAL

PARECER CONSUBSTANCIADO

Montes Claros, 02 de março de 2012.

Processo N.º 019
Título do Projeto: Avaliação metabólica e de Expressão do sistema renina Angiotensina (SRA) e Sirtuinas em camundongos da linhagem FVB/N submetidos à restrição calórica (RC).


Orientador: Prof. Dr. Sérgio Henrique Sousa Santos

Histórico
É sabido que as sirtuinas possuem papel primordial na regulação de inúmeras vias metabólicas e em processos adaptativos relacionados com a obesidade e os aspectos da síndrome metabólica. Estas incluem a expressão de citocinas pelos adipócitos (adipocinas), a maturação das células de gordura, a secreção de insulina e da sensibilidade dos tecidos, a modulação dos níveis plasmáticos de glicose, colesterol e homeostase lipídica e capacidade de energia mitocondrial. Inúmeros estudos mostram que a maioria dos benefícios relacionados à restrição calórica está ligada à redução dos depósitos de gordura, em especial da visceral e, conseqüentemente, das substâncias por ela produzidas, sendo tal processo irrefutável por sua reprodutibilidade, sendo a restrição calórica capaz de aumentar a expectativa de vida em indivíduos com obesidade abdominal por retardar o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Estudos recentes mostram o Sistema Renina-Angiotensina (SRA) não apenas como um regulador da pressão arterial e homeostasia cardiovascular, mas também como um complexo sistema hormonal envolvido nas mais diversas funções no organismo, relacionadas a processos metabólicos, por meio da atuação da Ang-(1-7). São conhecidas várias interações da Ang-(1-7) com a função endócrina do tecido adiposo, no entanto, a possível relação entre SRA, sirtuinas e RC ainda não são compreendidos. Neste contexto, os resultados do presente estudo permitirão a compreensão mais aprofundada dos mecanismos de atuação e de relação entre sirtuinas e componentes do SRA em modelos animais obesos submetidos a condições de restrição calórica, abrindo a perspectiva de desenvolvimento de novas propostas de intervenção para combate das doenças cardiometabólicas que mais acometem e matam a população mundial.

Mérito
O presente estudo teve como objetivo geral avaliar o perfil lipídico e glicêmico de camundongos da linhagem FVB/N submetidos à condições de restrição calórica. Tendo como objetivos específicos:

- Avaliar o padrão de expressão dos marcadores inflamatórios IL-1-β, IL-6, TNF-α e TGF-β.
- Avaliar o padrão de expressão de adipocinas (leptina, resistina e adiponectina).
- Avaliar a expressão de componentes no Sistema Renina-Angiotensina.
- Avaliar a expressão das sirtuinas em diversos tecidos.
- Avaliar a regulação glicêmica por meio de testes de sensibilidade insulínica e tolerância a glicose.
- Mensurar os níveis plasmáticos lipídicos, dosando especificamente os níveis de triglicérides, colesterol total e HDL.
- Comparar a histologia dos adipócitos entre grupos de animais.

Parecer
A Comissão de Ética em Experimentação e Bem-Estar Animal da Unimontes analisou o processo 019 e entende que o mesmo está completo e dentro das normas da Comissão e das Resoluções do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal. Sendo assim, somos pela APROVAÇÃO do projeto.


 Prof. Orlando Raptuel Lopes Júnior
 Presidente da Comissão de Ética em Experimentação e Bem-Estar Animal da UNIMONTES