



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA – BOTUCATU

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA
EM CLÍNICA MÉDICA
(ÁREA: CIÊNCIAS DA SAÚDE)

**INFLUÊNCIA DO BLOQUEIO DE RECEPTORES DO TIPO 1 (AT₁)
SOBRE O PERFIL METABÓLICO, ENDÓCRINO E
CARDIOVASCULAR DE RATOS OBESOS**

Silvio Assis de Oliveira Júnior

BOTUCATU – 2011

Silvio Assis de Oliveira Júnior

**INFLUÊNCIA DO BLOQUEIO DE RECEPTORES DO TIPO 1 (AT₁) SOBRE O
PERFIL METABÓLICO, ENDÓCRINO E CARDIOVASCULAR DE RATOS
OBESOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Fisiopatologia em Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Cicogna

BOTUCATU – 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Oliveira Júnior, Silvio Assis.

Influência do bloqueio de receptores do tipo 1 (AT₁) sobre o perfil metabólico, endócrino e cardiovascular de ratos obesos / Silvio Assis de Oliveira Júnior. – Botucatu : [s. n.], 2011

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Antonio Carlos Cicogna

Capes: 40101002

1. Angiotensina II. 2. Obesidade - Metabolismo. 3. Coração.

Palavras-chave: Angiotensina II; Coração; Metabolismo; Obesidade; Receptores AT₁.

DEDICATÓRIA

A meus pais, Marlene Braga de Oliveira e Silvio Assis de Oliveira, referências de sabedoria, dedicação e fé, por seus princípios intransigentes e perseverança em meio a incontáveis dificuldades e obstáculos na condução de seus filhos em busca de formação moral e intelectual.

Ao meu irmão, Sérgio Roberto de Oliveira.

À minha esposa, Paula Felipe Martinez, pelo constante apoio, dedicação e paciência, iluminando com amor minha vida e tornando-a digna e valiosa.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo suporte financeiro,
viabilizando o desenvolvimento desta investigação;

Ao corpo docente do programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica;

A meu orientador, Prof. Tit. Dr. Antonio Carlos Cicogna, pelo acolhimento profissional e
oportunidade de instrução. Caro Dr. Cicogna, agradeço pela paciência e confiança em todos
esses anos, ainda que em contraponto à minha ausência.

Ao Sr, minha admiração e eterna gratidão;

Aos docentes, Prof. Adj. Dr. Leonardo Antonio Mamede Zornoff e Prof. Tit. Dr. Carlos
Roberto Padovani, pelas inúmeras contribuições por ocasião do Exame Geral de Qualificação.
Em especial, prezado Prof. Padovani, agradeço pela confiança e oportunidades profissionais
concedidas. Muito obrigado;

Aos docentes Prof^a. Adj. Dr^a Marina Politi Okoshi e Prof. Adj. Dr. Katashi Okoshi, pela
amizade e incontáveis contribuições científicas;

A todos os funcionários da Secretaria de Pós-Graduação e Departamento de Clínica Médica;

Aos funcionários do Laboratório Experimental, pela colaboração e disponibilidade em todo
auxílio requisitado;

Aos amigos e companheiros do Laboratório, sejam os que já cumpriram seu papel, Mário
Sugizaki, André Leopoldo e Ana Paula, ou aqueles que ainda trabalham em Botucatu, como

Sandro Conde, André Nascimento, Renata, Maria Tereza, Priscila, Carlos, Paula Freire, Danielle Tomaz, Adriana e Loreta, que compartilharam de alegrias, dificuldades e expectativas.

Meus especiais agradecimentos a Bárbara Pereira, Dijon Campos, Aline Lima, Ricardo Damatto, Marcelo Cezar, Camila Bonomo e, principalmente, Daniele Guizoni, não só pela amizade e respeito, mas pela dedicação e consideração em toda ajuda profissional.

Aos colegas servidores e técnico-administrativos bem como alunos do curso de fisioterapia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), campus de Campo Grande/MS;

Em especial, a Paula Felipe Martinez, minha esposa, pela dedicação, apoio, perseverança, paciência e, inclusive, auxílio profissional;

A Deus, pela vida, saúde, sabedoria, oportunidades e, sobretudo, pelo convívio com todas as pessoas envolvidas na construção não somente deste trabalho, mas presentes em minha trajetória pela cidade de Botucatu, SP.

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e não substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”

(Charles Chaplin)

EPÍGRAFE

“Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas.”

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

Variados agentes moleculares ativam mecanismos determinantes de alterações teciduais do coração, com frequente ocorrência de interação bioquímica entre estímulos distintos, como vigente entre angiotensina II (Ang-II) e insulina. A sinalização molecular principiada pela Ang-II é carregada a partir do acoplamento com receptores do tipo 1 (AT₁) e culmina na ativação de proteínas quinases ativadas do mitógeno (MAPK), como *extracellular signal-regulated* (ERK) e *c-Jun N-terminal* (JNK). Em analogia, a ação da insulina sobre o receptor de insulina (βRI) determina a estimulação de respostas proliferativas e efeitos vinculados ao metabolismo de macro e micronutrientes. Por meio da ativação de receptores AT₁, a Ang-II interfere na sinalização da insulina, regulando a fosforilação de tirosina e dessensibilizando três mensageiros de estímulos metabólicos: o receptor (βRI), o substrato receptor de insulina (IRS) e o peptídeo *fosfatidil inositol 3 quinase* (PI3K). Embora essas manifestações configurem importantes mecanismos de resistência à insulina na obesidade, não foram encontrados estudos abordando essa relação em modelos experimentais de obesidade exógena. O objetivo deste trabalho foi testar a hipótese de que a obesidade acarreta distúrbios metabólicos, endócrinos e cardiovasculares, incluindo remodelação e resistência insulínica cardíaca, decorrentes da ativação de receptores AT₁. Ratos Wistar-Kyoto foram distribuídos em dois grupos: C e OB; ambos os grupos C e OB receberam, respectivamente, dietas padrão e hipercalórica durante 30 semanas. Na sequência, os grupos foram separados em quatro grupamentos: C, C+Los, OB e OB+Los. Ambos os grupos +Los foram tratados com losartan (30 mg/kg/dia), um fármaco antagonista de receptores AT₁, no decorrer de cinco semanas,. Subsequentemente, além da avaliação nutricional e biométrica, foram analisadas glicemia, lipidemia, insulina, leptina e atividade da enzima conversora de angiotensina. O estudo cardiovascular *in vivo* incluiu pressão arterial sistólica (PAS) e avaliação ecocardiográfica de estrutura e função ventricular. O perfil cardiovascular *post mortem* foi composto de análises morfológicas ventriculares nos aspectos macro e microscópico, caracterização das cadeias pesadas de miosina (MHC) e análise da

expressão miocárdica dos peptídeos angiotensina, ERK, JNK, RI e PI3K. Os resultados foram avaliados por meio de ANOVA e teste de Tukey. Eficiência alimentar, massa corporal e adiposidade foram ampliadas em ambos os grupos obesos. Diferentemente, a obesidade se associou com desordens de metabolismo glicêmico, insulinêmico e lipidêmico, os quais foram minimizados por meio do bloqueio antagonista de receptores AT₁. No aspecto cardiovascular *in vivo*, PAS, inalterada pela condição biométrica, revelou-se reduzida em ambos os grupos +Los. A análise ecocardiográfica da morfologia e função ventricular mostrou ocorrência de hipertrofia miocárdica, exacerbação do desempenho sistólico e diastólico com a obesidade; sob losartan, somente as mudanças diastólicas se mantiveram entre C+Los e OB+Los, acompanhadas de aumento da frequência cardíaca em ambos os grupos. Quanto ao perfil cardiovascular *post mortem*, em relação ao C, os ratos obesos apresentaram hipertrofia miocitária, fibrose intersticial e maior expressão de isoformas β -MHC. Com losartan, apenas a expressão de isoformas β -MHC manteve-se elevada na obesidade. No aspecto molecular, além de ampliar os índices de ERK, β RI fosforilado (Tyr^{1162,1663}- β RI) e PI3K total, a obesidade reduziu a expressão miocárdica de Ang-II e JNK. Na vigência de medicação, enquanto os efeitos relacionados a ativação de ERK e JNK na obesidade foram amortizados, as expressões peptídicas de angiotensina, Tyr^{1162,1663}- β RI, PI3K total e fosforilada (Tyr⁵⁰⁸-PI3K) revelaram-se ampliados no grupo OB+Los comparado ao C+Los. Em conclusão, a obesidade está associada com anormalidades metabólicas, endócrinas e cardiovasculares, associadas com acionamento do AT₁.

Palavras-chave: receptores AT₁; obesidade; angiotensina II; metabolismo; coração.

ABSTRACT

Several molecular agents trigger cytosolic mechanisms of cardiac remodeling, with common occurrence of biochemical interaction between different stimuli, as observed between angiotensin II (Ang-II) and insulin. The molecular signaling from Ang-II is carried through the coupling of the receptor type 1 (AT₁) and culminates in the activation of the mitogen activated protein kinases (MAPK), including *extracellular signal-regulated* (ERK) and *c-Jun N-terminal* (JNK). Similarly, the action of insulin on the insulin receptor (βRI) determines the stimulation of proliferative responses and multiple effects linked to metabolism of macro and micronutrients. Through activation of AT₁ receptors, Ang-II interferes with insulin signaling by regulating the phosphorylation of three messengers of metabolic stimuli from insulin: the receptor (βIR), insulin receptor substrate (IRS) and *phosphatidil inositol 3-kinase* (PI3K). Although these events configure important mechanisms of insulin resistance in obesity, there are no studies addressing this relationship in experimental models of exogenous obesity. This study investigated whether obesity causes metabolic, endocrine and cardiovascular diseases, including insulin resistance and cardiac remodeling, due activation of AT₁ receptors. Wistar-Kyoto rats (n=40) were subjected to control (C) or hypercaloric diet (OB) for 30 weeks and then assigned to four groups: C, C+Los, OB, and OB+Los. Los-groups received losartan (30mg/kg/day) during five weeks. Afterward, besides the nutritional and biometric analyzes, glycemia, lipids, insulin, leptin and activity of angiotensin-converting enzyme were also evaluated. *In vivo* cardiovascular study included systolic blood pressure (SBP) and echocardiographic evaluation of ventricular structure and function. Post mortem cardiovascular profile integrated analysis of ventricular morphology in the macro and microscopic aspects, myosin heavy chain (MHC) composition as well as myocardial expression of angiotensin, ERK, JNK, βIR and PI3K peptides. Results were evaluated by ANOVA and Tukey's test. Feed efficiency, body weight and adiposity were elevated in both obese groups. In contrast, obesity was associated with disorders of glucose metabolism, insulin and lipids, which were minimized by blocking of AT₁ receptor. Taking into account

cardiovascular profile, SBP, which was unchanged by the biometric condition, reduced in both groups +Los. Assessment of ventricular morphology and function evidenced occurrence of myocardial hypertrophy, improved systolic and diastolic performance in obesity condition; with losartan, only the diastolic parameters remained different between C+Los and OB+Los, and they were accompanied by increased heart rate in both groups. Regarding the post mortem cardiovascular profile, obese rats presented myocyte hypertrophy, interstitial fibrosis and increased expression of β -MHC isoforms. In presence of losartan, only the expression of β -MHC isoforms remained elevated in obesity. On a molecular level, associated to increased levels of ERK, obese group exhibited higher expression of phosphorylated β IR (Tyr^{1162,1663}- β RI) and PI3K, as well as reduced myocardial expression of angiotensin and JNK. In the presence of medication, while the effects related to activation of ERK and JNK have been neutralized, the expression of angiotensin peptide, Tyr^{1162,1663}- β RI, total and phosphorylated PI3K (Tyr⁵⁰⁸-PI3K) were elevated in the group OB+Los versus C+Los. In conclusion, obesity has been associated with metabolic and endocrine abnormalities, and cardiovascular diseases, related to activation of the AT₁ receptor.

Palavras-chave: AT₁ receptor; obesity; angiotensin II, metabolism, heart.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das vias sinalizadoras moleculares envolvidas em diferentes processos transcricionais comuns a remodelação cardíaca.....	26
Figura 2. Via de sinalização molecular da angiotensina II no miocárdio.....	27
Figura 3. Via de sinalização molecular insulínica.....	29
Figura 4. Interação molecular entre angiotensina II e insulina.....	32
Figura 5. Média e erro-padrão da (A) adiposidade (%) e (B) Índice de Lee: massa corporal (g) ^{1/3} /comprimento naso-anal (cm), segundo o grupo.....	55
Figura 6. Concentrações séricas de (A) insulina e (B) leptina; (C) HOMA (<i>homeostatic model assessment</i>)= glicose (mg/dL)×insulina (ng/dL)/ 405; (D) atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA), segundo condição biométrica e medicação.....	58
Figura 7. Avaliação morfométrica miocárdica; (A) área seccional cardiomiocitária, (B) fração intersticial de colágeno, (C) área e (D) volume do núcleo cardiomiocitário, segundo o grupo.....	65
Figura 8. (A) Bandas correspondentes às isoformas α - e β - das cadeias pesadas de miosina (MHC) do miocárdio, segundo condição biométrica e medicação; (B) Razão entre as isoformas β e α -MHC e (C) composição relativa (%) da β -MHC do miocárdio, segundo o grupo.....	66
Figura 9. Níveis de expressão protéica de (A) angiotensina, (B) <i>extracellular signal-regulated kinase</i> (ERK) e (C) <i>c-Jun N-terminal kinases</i> (JNK), procedentes do miocárdio e obtidos por Western-Blot.....	68
Figura 10. Níveis de expressão protéica de (A) subunidade β do receptor de insulina (β RI) procedente do miocárdio e (B) β RI com fosforilação sob resíduos de tirosina (Tyr ^{1162, 1163} -	

β RI)..... 69

Figura 11. Níveis de expressão protéica de (A) subunidade catalítica p85 do *phosphatidil inositol 3 quinase* (PI3K) procedente do miocárdio e (B) PI3K sob fosforilação de resíduos de tirosina da posição 508 (Tyr⁵⁰⁸-PI3K)..... 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos animais segundo grupos de estudo.....	40
Tabela 2. Média e desvio-padrão da ingestão diária de losartan (mg/Kg de massa corporal) segundo condição biométrica.....	53
Tabela 3. Avaliação nutricional e biométrica segundo grupo e momento de análise.....	54
Tabela 4. Comportamento da área sob a curva de tolerância glicêmica, segundo condição biométrica, medicação e momento de análise.....	56
Tabela 5. Perfil glicêmico e lipidêmico sérico segundo condição biométrica e medicação.....	57
Tabela 6. Comportamento da pressão arterial sistólica (mmHg) segundo condição biométrica, medicação e momento de avaliação.....	59
Tabela 7. Avaliação ecocardiográfica do ritmo contrátil e da estrutura cardíaca segundo condição biométrica e medicação.....	60
Tabela 8. Avaliação ecocardiográfica do desempenho sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo segundo condição biométrica e medicação.....	62
Tabela 9. Avaliação morfológica do coração segundo condição biométrica e medicação.....	64

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	24
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2.1. Animais e protocolo experimental.....	35
2.2. Composição das dietas.....	37
2.3. Avaliação nutricional e biométrica.....	38
2.4. Critério para permanência amostral e constituição dos grupos.....	39
2.5. Perfil metabólico.....	40
2.5.1. Teste de tolerância à glicose.....	40
2.5.2. Glicemia e lipidemia.....	41
2.6. Perfil endócrino.....	41
2.7. Perfil cardiovascular <i>in vivo</i>	42
2.7.1. Pressão arterial sistólica.....	42
2.7.2. Análise da morfologia e função cardíaca.....	43
2.8. Perfil cardiovascular <i>post-mortem</i>	44
2.8.1. Análise morfológica macroscópica.....	45
2.8.2. Análise morfológica microscópica do tecido cardíaco.....	45
2.8.3. Análise das cadeias pesadas de miosina do miocárdio.....	46
2.8.3.1. Processamento de amostras.....	47
2.8.3.2. Preparação e composição de géis.....	47
2.8.3.3. Eletroforese de proteínas cardíacas.....	48

2.8.4. Avaliação da expressão das proteínas cardíacas.....	49
2.9. Procedimentos de análise estatística.....	51
3. RESULTADOS.....	52
3.1. Caracterização nutricional e biométrica.....	53
3.2. Perfil Metabólico.....	55
3.2.1. Comportamento glicêmico.....	55
3.2.2. Caracterização bioquímica: glicemia e lipídemia.....	56
3.3. Perfil endócrino.....	57
3.4. Perfil cardiovascular <i>in vivo</i>	59
3.5. Perfil cardiovascular <i>post-mortem</i>	63
3.5.1. Caracterização morfológica macro e microscópica de miocárdio.....	63
3.5.2. Caracterização miocárdica de cadeias pesadas de miosina.....	66
3.5.3. Caracterização molecular de proteínas cardíacas.....	67
4. DISCUSSÃO.....	72
5. CONCLUSÃO.....	105
6. REFERÊNCIAS.....	107

1. INTRODUÇÃO

A remodelação cardíaca configura um processo adaptativo do miocárdio voltado à manutenção do desempenho funcional em face de solicitações hemodinâmicas anômalas, como sobrecarga mecânica pressórica e volumétrica ⁽¹⁾. Embora se inicie rapidamente, a remodelação exibe evolução tempo-dependente e consiste de alterações de natureza molecular, celular e intersticial, que se manifestam, clinicamente, por modificações na forma, tamanho e função do coração ^(1, 2). A designação do fenótipo cardíaco envolve modificações na expressão e composição de várias proteínas implicadas no mecanismo de excitação-contração-relaxamento, como filamentos contráteis, peptídeos reguladores do trânsito de cálcio e componentes do citoesqueleto, além de respostas morfológicas, como hipertrofia e fibrose intersticial miocárdica ⁽¹⁻⁴⁾. Frente a demandas exacerbadas e crônicas, o recrudescimento desses indicadores pode abarcar alterações de função, eletrofisiologia e perfusão miocárdica, ampliando os riscos de ocorrência de isquemia, insuficiência cardíaca, arritmias e morte súbita ⁽¹⁻⁴⁾.

Diversos processos mecânicos e/ou bioquímicos principiados no sarcolema, como deformação parietal, ação de citocinas e fatores de crescimento, podem orquestrar o curso da remodelação miocárdica ⁽⁴⁾. Esses estímulos extracelulares ativam vias de sinalização molecular que, regulando diversos mecanismos transcricionais, determinam alterações do coração em decorrência de circunstâncias de estresse funcional. Na vigência de mecanismos citosólicos distintos, são comuns inúmeros pontos de convergência entre vias sinalizadoras, ocasionando complexa interação molecular advinda de estímulos extracelulares concorrentes ⁽³⁾ (Figura 1). Nesta perspectiva, várias evidências confirmam a ocorrência de interação, *cross-talk*, entre angiotensina II, o principal peptídeo do sistema renina-angiotensina (SRA), e a insulina ⁽⁵⁻⁹⁾.

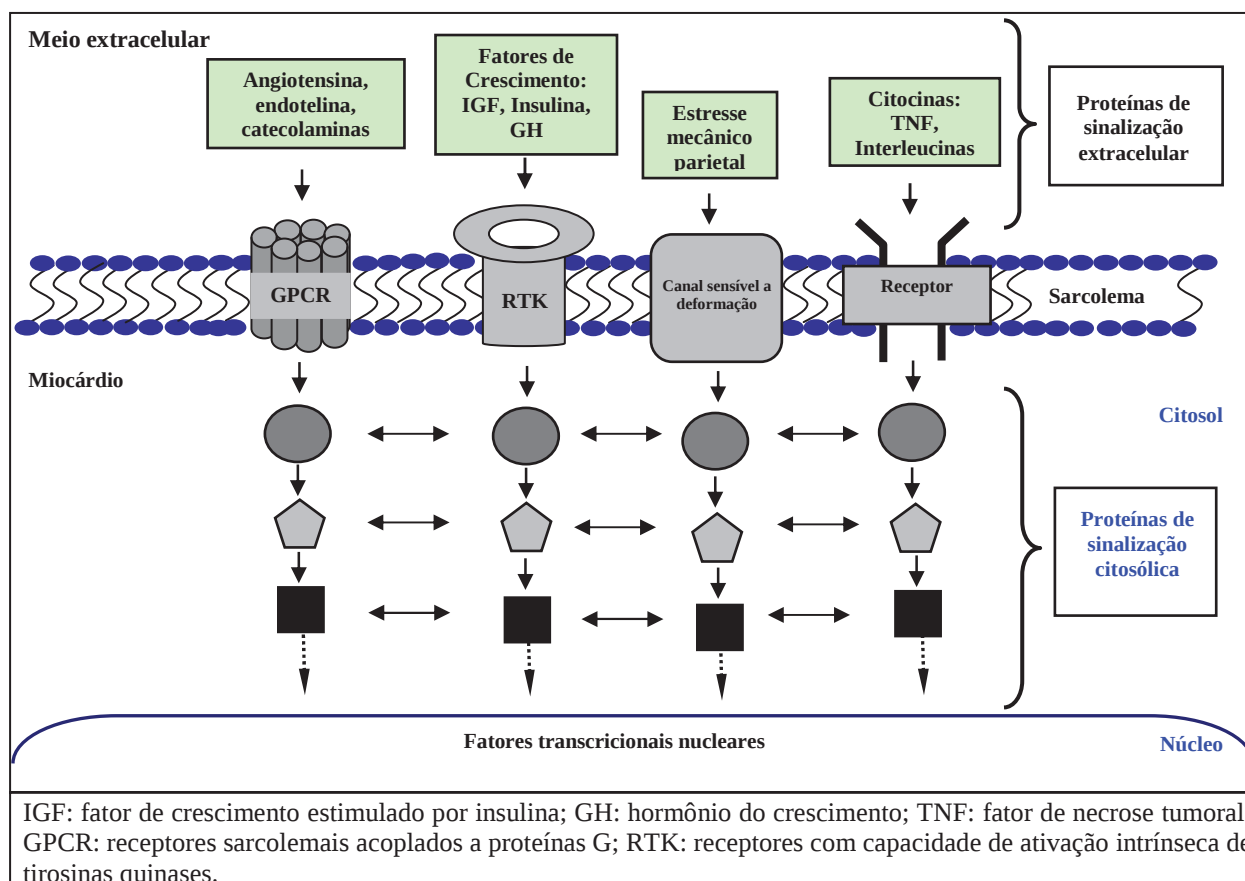


Figura 1. Representação esquemática das vias sinalizadoras moleculares envolvidas em diferentes processos transcricionais comuns a remodelação cardíaca

A sinalização molecular principiada pela **angiotensina II (Ang-II)** é carregada, principalmente, por meio do acoplamento com receptores do tipo 1 (**AT₁**)⁽¹⁰⁻¹²⁾. O acionamento do receptor **AT₁** canaliza diversas vias sinalizadoras direcionadas, entre outros, à promoção de crescimento, diferenciação e proliferação celular, processos inflamatórios e estresse oxidativo^(10, 11). Esse receptor é ligado, na sua porção citosólica, a um complexo protéico heterotrimérico acoplado a moléculas de difosfato de guanina (GDP), as proteínas **G**^(3, 11, 12). Esse intrincado de peptídeos é composto de três subunidades: **Gα**, **Gβ** e **Gγ**. A conexão da Ang-II com o **AT₁** determina a conversão de GDP em trifosfato de guanina (GTP) junto à subunidade **Gα**, com resultante dissociação dos agentes ativados **Gα** e **Gβγ**, os quais agem como importantes mensageiros citosólicos^(8, 10). Dentre várias vias subjacentes, a proteína fosforilada **Gα** estimula, principalmente, a molécula fosfolipase C (PLC), a qual induz a formação de trifosfato de inositol

(IP₃) e diacilglicerol (DAG), seguida da liberação citoplasmática de Ca⁺⁺ e subsequente ativação das proteínas quinases C (PKC) ^(4, 10, 11). Na sequência, as PKCs ativam a família de proteínas quinases ativadas do mitógeno (MAPK), que inclui os peptídeos *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) e *p38* (p38K) ⁽¹³⁻¹⁵⁾ (Figura 2). As MAPKs regulam a transcrição gênica de diversos mensageiros envolvidos na sobrevivência, apoptose, diferenciação celular e remodelação cardíaca ^(14, 15). A estimulação do eixo Gα/ PLC/ IP₃/ PKC/ MAPK canaliza as principais alterações fenotípicas secundárias à ação da Ang-II no miocárdio ^(16, 17).

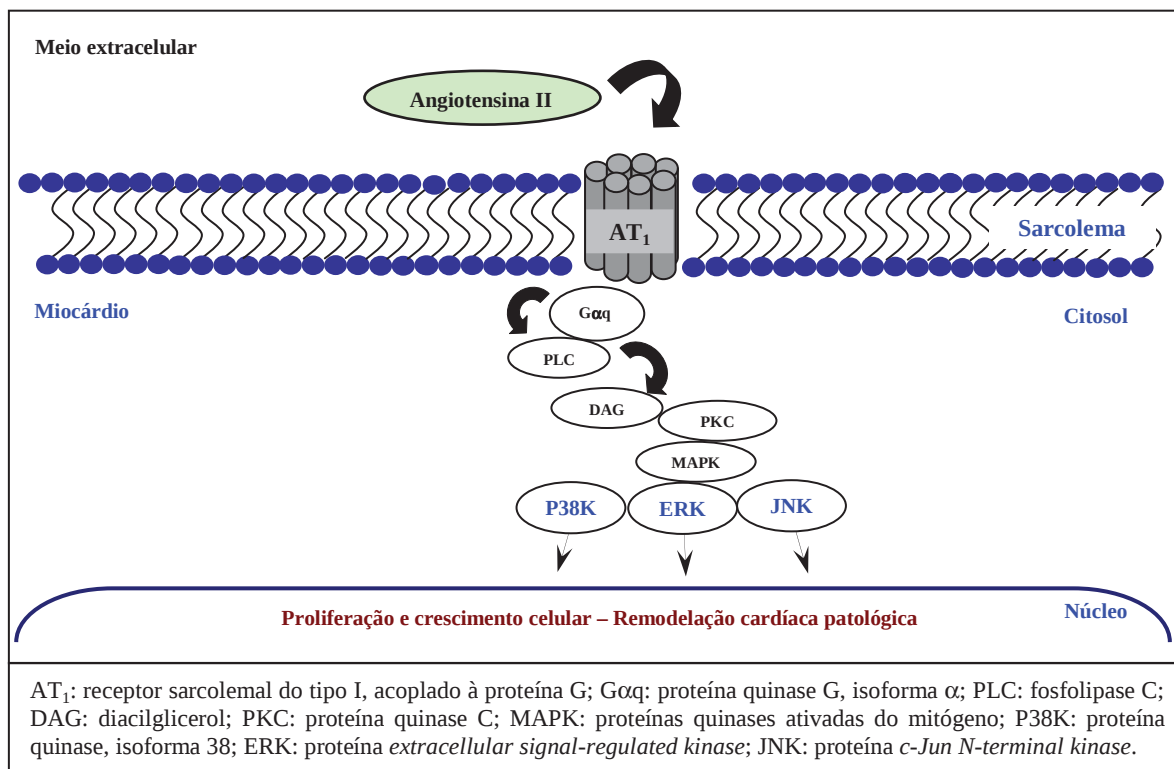


Figura 2. Via de sinalização molecular da angiotensina II no miocárdio

Em comum com a Ang-II, dentre variados fatores de proliferação e crescimento que regem a remodelação miocárdica, a **insulina** constitui um importante hormônio sintetizado pelas células β do pâncreas com efeitos endócrinos em diferentes tecidos alvos ^(18, 19). Embora configure um hormônio classicamente envolvido na regulação do metabolismo glicêmico, a

insulina exibe ações multifatoriais, modulando variadas funções celulares, como metabolismo de proteínas e lipídeos, transporte de íons e aminoácidos, proliferação, diferenciação e ciclo celular, apoptose e síntese de óxido nítrico ^(19, 20). No **miocárdio**, a cascata de sinalização insulínica se inicia com o acoplamento molecular desse hormônio a um receptor sarcolemal específico – o receptor de insulina (β RI). Esta estrutura, com capacidade tirosina-quinase intrínseca, exibe complexa conformação estrutural, sendo composta por duas subunidades extracelulares α e duas porções transmembranais β ⁽²¹⁾. A conexão da insulina junto ao β RI determina a autofosforilação de resíduos específicos de tirosina, presentes nas subunidades β dessa organela ^(19, 21). Uma vez acionado, um importante número de mensageiros moleculares são reconhecidamente ativados pelo β RI, incluindo membros da família de substratos receptores de insulina (IRS), isoformas da proteína adaptadora *Shc*, peptídeos da família *SIRP*, além das proteínas *Gab-1*, *p60*, *Cbl* e *APS* ⁽¹⁹⁾. Dentre estes recrutamentos moleculares distintos, tem-se a estimulação de dois importantes eixos moleculares que propiciam, respectivamente, respostas proliferativas, comuns à remodelação cardíaca, e efeitos vinculados ao metabolismo de macro e micronutrientes ⁽²¹⁾ (Figura 3).

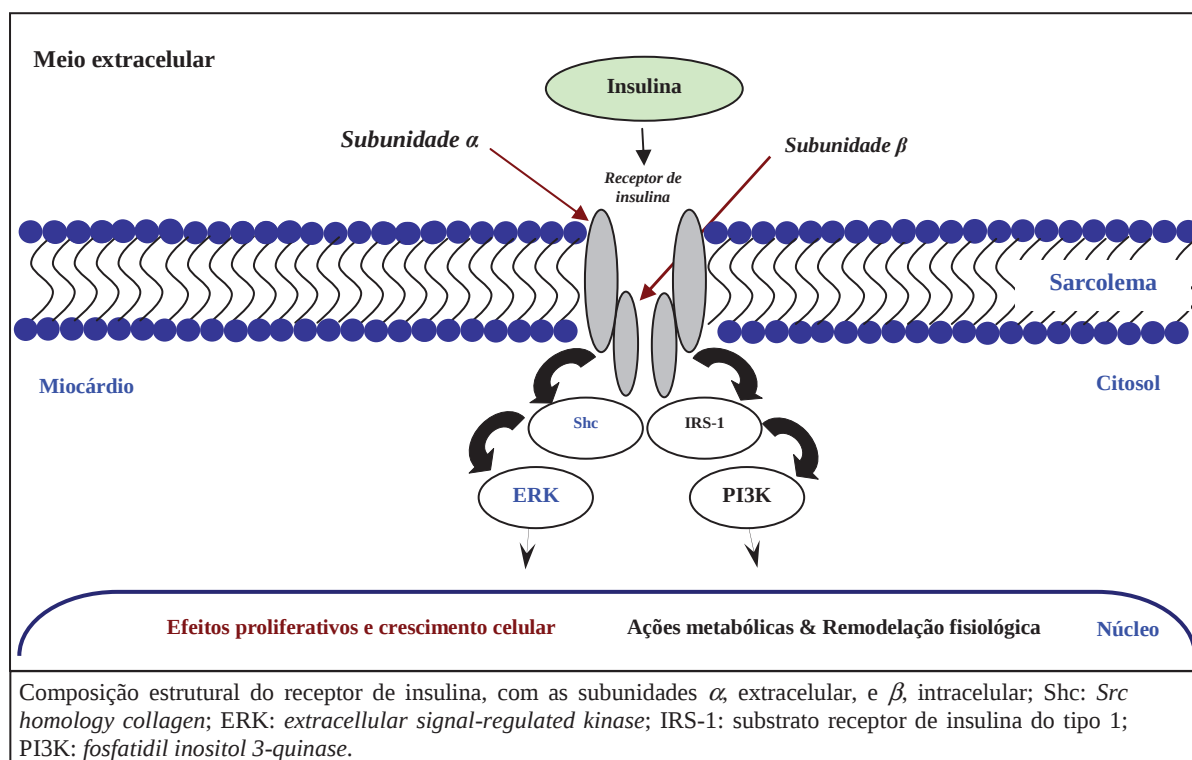


Figura 3. Via de sinalização molecular insulínica

Considerando-se as respostas **proliferativas** ligadas a insulina, a fosforilação de isoformas de proteína adaptadora *Shc* envolve o recrutamento e estimulação do peptídeo *Ras* que estimula a proteína *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), um subtipo de MAPK ⁽²¹⁾. As alterações fenotípicas carregadas por esta via sinalizadora envolvem síntese de proteínas e crescimento celular, respostas associadas ao processo de remodelação miocárdica ^(4, 13, 22).

No contexto **metabólico**, ao ser ativado, o β RI induz a fosforilação citosólica de substratos receptores de insulina, envolvendo, principalmente, os subtipos IRS-1 e IRS-2 ⁽²³⁾. A fosforilação de proteínas IRS designa sítios de reconhecimento para diversos mensageiros bioquímicos com domínios *SH2* destinados ao acoplamento com resíduos de tirosina ^(19, 21). Dentre essas moléculas, o acionamento do peptídeo *phosphatidil inositol 3 quinase* (PI3K) desencadeia ações metabólicas relacionadas a promoção de sobrevivência, remodelação cardíaca fisiológica e inibição da morte celular ^(19, 21) (Figura 3). O PI3K configura uma proteína heterodimérica, composta de uma subunidade catalítica p110 e uma subunidade regulatória p85,

a qual contém domínios *SH2* destinados ao acoplamento com resíduos de tirosina do β RI e com IRS-1, no estado fosforilado ⁽¹⁹⁾. Esta cascata de fosforilações em tirosina determina, majoritariamente, efeitos metabólicos, como síntese e translocação sarcolemal de receptores GLUT-4 e CD-36, responsáveis, respectivamente, pela captação de glicose e ácidos graxos de cadeia longa ^(19, 21). Portanto, além da remodelação cardíaca, os efeitos endócrinos derivados da ação insulínica mostram-se extensivamente relacionados ao metabolismo miocárdico de glicídeos e lipídeos.

Em geral, o controle da sinalização insulínica metabólica está associado a um balanço entre a modulação negativa e positiva dependente, respectivamente, de menor e maior fosforilação de sítios específicos de tirosina de mensageiros metabólicos da via β RI/ IRS/ PI3K ^(19, 20). Como evidência da importância da insulina na manutenção da homeostase metabólica, distúrbios de sinalização molecular da via β RI/ IRS/ PI3K configuram as principais causas de **resistência insulínica na obesidade** ^(24, 25), uma condição de relevante abrangência epidemiológica, que afeta países desenvolvidos e subdesenvolvidos ^(26, 27). Sob esta circunstância clínica, tecidos classicamente ativados pela insulina, como fígado, tecido adiposo e músculos esqueléticos, tornam-se menos sensíveis ao estímulo hormonal ^(19, 28). Dentre os efeitos mais precoces, incluem-se menor captação glicídica por adipócitos e fibras musculares e inabilidade insulínica em suprimir a gliconeogênese hepática ^(19, 23, 28). Em resposta a este processo, as células β pancreáticas ampliam a secreção de insulina, na busca de se manter a euglicemia; em estados crônicos, este efeito culmina na instituição de hiperinsulinemia, muitas vezes acompanhada de hiperglicemia sistêmica ⁽²⁸⁾. Em razão da natureza pleiotrópica dos efeitos hormonais, a dessensibilização insulínica impacta também no metabolismo de macronutrientes ⁽¹⁹⁾, tornando comum a ocorrência de desordens lipidêmicas, além de hiperleptinemia e hipertensão arterial em obesos ^(18, 19, 24).

Entre os **mecanismos de resistência à insulina na obesidade**, incluem-se diversos agentes, como citocinas inflamatórias, ácidos graxos, estresse oxidativo e **Ang-II** ^(5-9, 29).

Inúmeras investigações mostram que a **obesidade** está associada com **exacerbação do SRA**; todos os membros desse sistema, como angiotensinogênio, renina, aldosterona, enzima conversora de angiotensina (ECA) e receptores AT₁, são secretados pelo tecido adiposo e regulados pelo grau de adiposidade ^(24, 27, 30). A atividade plasmática de renina, que catalisa a formação de angiotensina I a partir do angiotensinogênio, está aumentada em pacientes ^(31, 32) e cães ⁽³³⁾ obesos. Em ratos, a formação de Ang-II em compartimentos adiposos marrom ⁽³⁴⁾ e branco ⁽³⁵⁾ foi bloqueada, respectivamente, pelo inibidor da ECA, captopril, e pelo antagonista de AT₁, losartan.

Sistemicamente, a relação entre acionamento de receptores AT₁ pela Ang-II e resistência a insulina é evidenciada em estudos clínicos ^(37, 38) e experimentais ⁽³⁹⁻⁴¹⁾ envolvendo obesos. Nestes estudos, intervenções farmacológicas, destinadas a atenuar a ação da Ang-II, repercutiram em redução da pressão arterial e melhor sensibilização a ação da insulina na musculatura esquelética. Em ratos obesos da linhagem *Zucker*, com hiperinsulinemia e hiperativação do SRA, intervenções com inibidores da ECA ^(42, 43) e com antagonista de AT₁ ⁽⁴¹⁾, atenuaram a resistência sistêmica à insulina, pressão arterial e dislipidemias. Portanto, processos moleculares ativados pela insulina, via fosforilação de resíduos de tirosina, podem sofrer modulação negativa da Ang-II ⁽⁸⁾, configurando um mecanismo de resistência insulínica sistêmica em ensaios clínicos e modelos genéticos de obesidade.

Como modulador heterólogo, a Ang-II, por meio da ativação de receptores AT₁, interfere na sinalização citosólica da insulina, regulando a fosforilação de tirosina e dessensibilizando três mensageiros de estímulos insulinêmicos: o receptor, o IRS-1 e o PI3K ^(6, 8) (Figura 4). Esta ação inibitória da Ang-II pode ser efetivada por moléculas com propriedade serina-quinase, como MAPK, dentre as quais ERK e JNK ^(8, 9). Embora este processo interativo tenha sido demonstrado no tecido vascular, são escassas as evidências sobre a vigência desse mecanismo no miocárdio ⁽³⁶⁾. Carvalheira et al. ⁽⁴⁴⁾ constataram, em ratos obesos *Zucker*, que a infusão aguda e isolada de Ang-II culminou em inibição da via metabólica IRS-1/PI3K no

miocárdio. Além de não reverter esses efeitos, a administração de insulina associada a Ang-II culminou em exacerbação da proteína MAPK-ERK, via *Shc* ⁽⁴⁴⁾; portanto, a interação entre Ang-II e insulina, além de resultar em resistência insulínica, pode ocasionar processos de sinalização direcionados a ocorrência de remodelação cardíaca na obesidade.

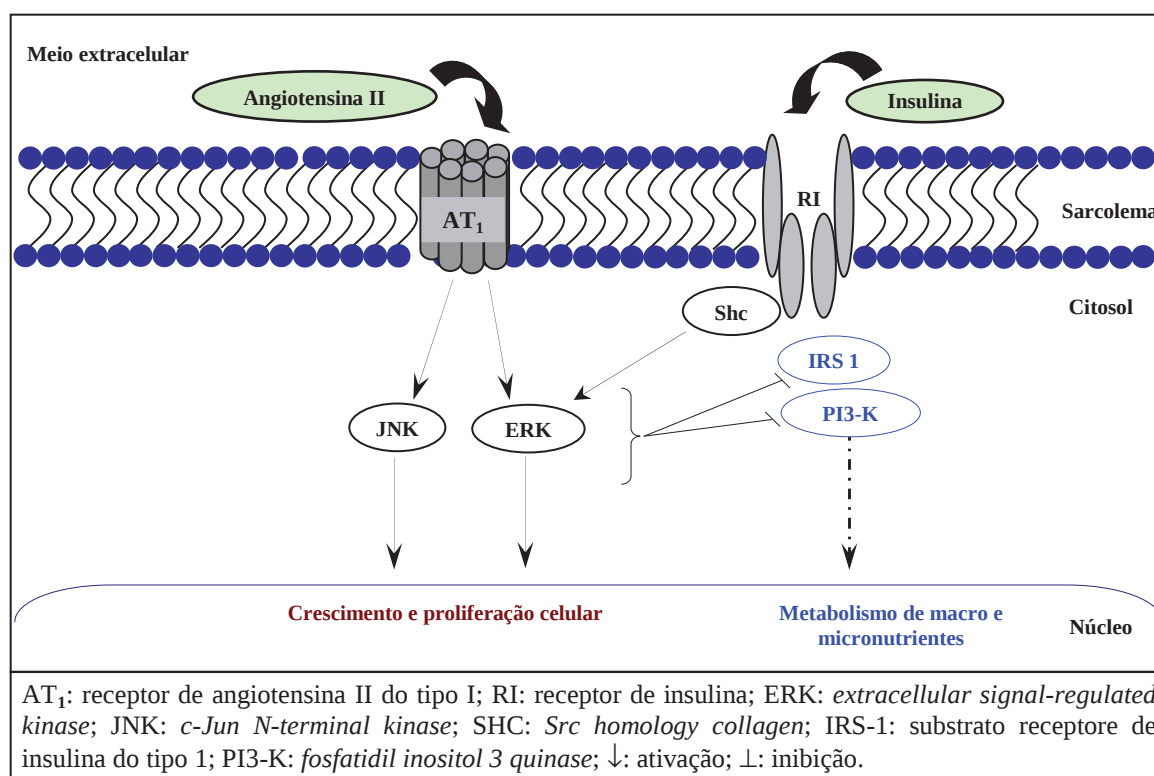


Figura 4. Interação molecular entre angiotensina II e insulina

Sob estas considerações, intervenções com inibidores da ECA ^(42, 43) e antagonista de AT₁ ⁽⁴¹⁾ atenuaram a hipertrofia miocitária ^(41, 42) e a fibrose intersticial miocárdica ⁽⁴³⁾, além de promover benefícios metabólicos em ratos geneticamente obesos *Zucker*. Portanto, a resistência insulínica constitui um processo molecular seletivo que envolve, predominantemente, efeitos metabólicos restritos à via β RI/ IRS/ PI3-K, com preservação ou, inclusive, exacerbação de mecanismos proliferativos resultantes da ativação de MAPK ^(24, 44). Nesta perspectiva, é possível se reear que esses processos configurem causas de resistência à insulina e remodelação miocárdica em modelos experimentais de obesidade exógena. No aspecto fisiopatológico, é bem evidenciado que esta modalidade de investigação é mais representativa da obesidade humana ^{(45,}

⁴⁶⁾. Contudo, poucos estudos confirmaram a associação entre acionamento de AT₁, remodelação e resistência à insulina no miocárdio de roedores com obesidade exógena, isto é, induzida por dieta. Du Toit et al. ⁽⁴⁷⁾ constataram aumento dos níveis sistêmicos de Ang-II e hipertrofia do miócito em ratos Wistar obesos por dieta hipercalórica. A administração de um antagonista de AT₁ culminou em minimização da remodelação cardíaca. Variavelmente, entretanto, os autores constataram modificações metabólicas discretas, sem confirmação de hiperinsulinemia sistêmica e não investigaram a sinalização insulínica no coração de ratos com obesidade exógena.

Considerando-se a associação entre distúrbios metabólicos e remodelação cardíaca, inúmeros trabalhos procedentes de nosso laboratório mostraram que ratos obesos por dieta hipercalórica apresentam importantes desordens metabólicas, como dislipidemias e resistência à insulina, hormonais, como hiperleptinemia, e remodelação cardíaca, subsidiada por hipertrofia miocitária e nuclear, fibrose intersticial, desordens funcionais e alterações fenotípicas de proteínas contráteis ⁽⁴⁸⁻⁵⁴⁾. Levando-se em conta o papel do acionamento de receptores AT₁ como agente promotor de efeitos sistêmicos e cardiovasculares, na obesidade, é relevante se sugerir que o SRA mantenha relação com as alterações apresentadas nesses estudos prévios.

Assim, o propósito deste trabalho é testar a hipótese de que a obesidade acarreta distúrbios metabólicos, endócrinos e cardiovasculares, incluindo remodelação e resistência insulínica cardíaca, anormalidades que estão associadas com ativação de receptores AT₁. Para consolidar estes preceitos, o bloqueio de receptores AT₁ deve amainar, parcial ou totalmente, esses distúrbios derivados da condição biométrica. Para tanto, serão analisados o perfil metabólico e endócrino e comportamento cardiovascular, pautado em análises hemodinâmicas *in vivo* e estudo *post-mortem* da remodelação cardíaca, nos aspectos morfológico, funcional e molecular.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais e protocolo experimental

Foram utilizados 52 ratos da linhagem Wistar Kyoto (WKY), machos e com 60 dias de idade, obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – *campus* de Botucatu/ SP. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais: WKY-DN (n=26), WKY-DH (n=26). O grupo WKY-DN foi tratado com ração normocalórica comercial (Agrocere[®])⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾ e água *ad libitum*. O grupo WKY-DH foi submetido a uma dieta hipercalórica, composta de uma combinação de cinco diferentes dietas (DH-I, DH-II, DH-III, DH-IV e DH-V), sucedidas semanalmente, por um período de 30 semanas.

Embora irrefutável montante de estudos sobre obesidade exógena seja fundamentada em ratos da tradicional espécie *Rattus norvegicus* (Wistar)^(45, 47, 48, 52, 60), no presente trabalho, a inserção de congêneres WKY foi pautada em evidências precedentes^(49, 50, 61). Em face de dietas com importante aporte lipídico e sacarídeo, ratos WKY revelaram ser mais susceptíveis a desordens endócrinas e cardiovasculares e, inclusive, menor sobrevida, em comparação a animais Wistar^(61, 62). Aliado a essas premissas, evidências relacionadas a ratos Wistar obesos, obtidas em nosso laboratório, têm se mostrado conflitantes; como exemplo, enquanto alguns estudos^(48, 52) documentaram ocorrência de hipertensão arterial e hipertrofia cardíaca, investigações mais recentes não reproduziram esses achados^(53, 54).

Em consideração à idade inicial dos animais estudados, inúmeros trabalhos prévios^(48, 52-57) sobre ratos Wistar com obesidade exógena envolveram, em geral, parcelas na faixa etária de 30 dias, recém-desmamadas. Em contraste, em conformidade com investigações precedentes^(49, 50), os animais WKY do presente estudo portavam, inicialmente, 60 dias de idade, configurando-se adultos jovens. Estas dissensões entre os modelos decorrem do fato de que os congêneres WKY constituem um modelo experimental de depressão infantil⁽⁶³⁾. Nesta

perspectiva, animais WKY pré-púberes comumente apresentam maior susceptibilidade à depressão e ansiedade manifestadas ao isolamento social precoce^(63, 64). Individualizados, podem desenvolver comportamento letárgico, culminando em menor ingestão nutricional e consequente subdesenvolvimento ponderal, um quadro conhecido como *anhedonia*⁽⁶³⁾. Portanto, para assegurar que esta condição não se manifestasse após o condicionamento em caixas individuais, a faixa etária inicial da amostra integrou 60 dias.

Após 30 semanas de intervenção dietética, cada grupo foi separado em dois subgrupos: DN e DN+Los; DH e DH+Los. Os subgrupos DN e DH continuaram recebendo as respectivas dietas durante mais um ciclo de cinco semanas de intervenção. Durante período semelhante, os grupamentos DN+Los e DH+Los, além do suporte nutricional, foram tratados com losartan (Los), um fármaco antagonista de receptores AT₁, na dosagem diária de 30 mg/kg de massa corporal⁽⁴⁷⁾. O medicamento foi administrado junto à água ingerida pelos animais dos grupos DN e DH, na proporção de 0,5 a 0,75 g por litro de água, respectivamente, para os grupos DN e DH. Estas diferentes diluições foram pautadas em estudo piloto, realizado entre agosto/2008 e março/2009. Além de bloquear o acoplamento sarcolemal da Ang-II, na dosagem prescrita, a administração de losartan culmina em inibição endógena da ECA, designando reduzida formação local de Ang-II⁽¹⁰⁾.

Classicamente, o losartan configura um fármaco com propriedades de antagonismo competitivo e altamente seletivo de receptores AT₁⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾. Embora muitos outros bloqueadores de AT₁, componentes da família *Sartans*^(65, 66), sejam reconhecidamente eficazes e bem utilizados clinicamente, o losartan foi o primeiro composto não-peptídico desenvolvido industrialmente. O princípio de ação deste antagonista de AT₁ é mediado pela presença da unidade química *bifenil tetrazole*⁽⁶⁷⁾; este atributo fundamenta também a ação dos demais bloqueadores do receptor AT₁. Quanto à propriedade seletiva, apesar de outros receptores de Ang-II, como AT₂ e AT₄, serem bem caracterizados, o losartan revelou ser 10 mil vezes mais seletivo a receptores AT₁ em relação ao AT₂⁽⁶⁵⁾. Subsequente à ingestão, o medicamento é

rapidamente absorvido em 30 a 60 minutos, sendo que a maior porção é metabolizada via oxidação enzimática exercida por citocromos da família P450 e/ou mediante mecanismos de glucoronidação efetuada por *UDP-glucronyl transferases* ⁽⁶⁵⁾. A principal via de processamento metabólico do losartan é derivada da ação de isoenzimas P450 ⁽⁶⁶⁾; nesses processos, a oxidação do losartan culmina na formação do metabólito E3174, que é 10 a 40 vezes mais potente do que o próprio medicamento original e é responsável pelo bloqueio intransponível do receptor AT₁ ^(66, 68). Enquanto a meia-vida do losartan está na faixa de 1,5 a 3,2 horas, a meia-vida do E3174 se estende de 4,4 a 6,4 horas ⁽⁶⁵⁾.

Além do controle medicamentoso, a ingestão alimentar foi mensurada diariamente, enquanto a ingestão hídrica foi aferida semanalmente. No decorrer da etapa experimental, os ratos foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclos de luminosidade (12:12 h). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética Experimental em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

2.2. Composição das dietas

As dietas experimentais seguiram as especificações do “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”, publicado pelo “U. S. National Institutes of Health” ⁽⁶⁹⁾. Detalhada composição bromatológica foi recentemente publicada ^(50, 53). As rações DH-1, DH-2, DH-4 e DH-5 foram preparadas a partir de uma mistura de dieta padrão e alimentos industrializados, complementada com adequada suplementação vitamínica e mineral. As dietas hipercalóricas apresentaram maior densidade energética em relação à dieta padrão (4,6 kcal/g vs. 3,2 kcal/g) ⁽⁵⁰⁾. Entretanto, enquanto as intervenções DH-II e DH-IV continham maior aporte lipídico, os tratamentos DH-1 e DH-5 também exibiam importante concentração de carboidratos, especialmente sacarose. Com relação à DH-3, junto à dieta padrão, ministrou-se sacarose

adicionada a água ingerida pelos animais. As cinco intervenções eram isocalóricas entre si e portavam cerca de 30% a mais de energia, comparadas à dieta padrão. Inúmeros estudos de nosso grupo de pesquisa utilizaram modelo similar de indução à obesidade em ratos ⁽⁴⁸⁻⁵⁴⁾.

2.3. Avaliação nutricional e biométrica

Para caracterizar os grupamentos experimentais segundo condição biométrica, a avaliação nutricional englobou ingestão calórica, eficiência alimentar e adiposidade corporal. A ingestão calórica foi calculada pela seguinte fórmula: ingestão alimentar semanal multiplicada pelo valor calórico de cada dieta ^(48-54, 70, 71). Com a finalidade de analisar a capacidade de conversão da energia alimentar consumida em massa corporal, foi considerado a eficiência alimentar (EA), obtida a partir da relação entre variação ponderal total (g) e energia total ingerida (Kcal) pelos animais ^(48-54, 70, 71).

Por sua vez, a composição biométrica envolveu a massa corporal, adiposidade e índice de Lee ⁽⁷¹⁾. A massa corporal foi mensurada semanalmente, utilizando-se uma balança digital Mettler® modelo Spider 2 (Toledo do Brasil Indústria de Balanças Ltda, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil). Para a obtenção das informações sobre a adiposidade, foi mensurada a gordura provinda de depósitos segmentares específicos. Após a eutanásia, foram executadas toracotomia e laparotomia mediana para remoção de fragmentos cardiopulmonares e retirada de tecidos adiposos brancos dos compartimentos retroperitoneal, epididimal e visceral. Por conseguinte, um índice de adiposidade (%) foi obtido a partir da relação percentual entre massa adiposa e massa corporal final: $\Sigma AD \times 100 / MC$ ^(50, 51). Para a obtenção do Índice de Lee, considerou-se a relação: $MC(g)^{1/3} / \text{comprimento naso-anal (cm)}$ ⁽⁷¹⁾.

2.4. Critério para permanência amostral e constituição dos grupos experimentais

Em ensaios científicos de natureza experimental, embora fixadas as condições ambiente e operacional, o acaso e a individualidade inerente às parcelas de estudo podem contribuir para a obtenção de importante heterogeneidade de resposta, ainda que fixado o fator de investigação. Assim, animais sob intervenções similares podem externar relevante variabilidade de comportamento ⁽⁷⁰⁾.

Sob estas considerações, ao final do período experimental de 35 semanas, foi construído um intervalo de 95% de confiança para a média do índice de adiposidade corporal de cada subgrupo (DN e DH; DN+Los e DH+Los). A seguir, foi estabelecido um ponto de separação (PS) para referenciar os valores de adiposidade dos animais de cada subgrupo. Fixado o nível de medicação, o ponto médio entre o limite superior do subgrupo DN e o limite inferior do subgrupo DH. Foram excluídos animais do subgrupo DN com índice acima do PS e do subgrupo DH com valores abaixo do PS ⁽⁵⁰⁾. Procedimento similar foi realizado para os subgrupos submetidos à administração de losartan, DN+Los e DH+Los.

Frente à nova composição amostral, os subgrupos DN, DH, DN+Los e DH+Los passaram a corresponder, respectivamente, aos grupos de estudo C (Controle), OB (Obeso), C+Los (Controle tratado com losartan) e OB+Los (Obeso tratado com losartan), caracterizados pelas quatro combinações resultantes dos dois fatores de interesse da pesquisa: condição biométrica e medicação (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição dos animais segundo grupos de estudo

Grupo de estudo	Início	Final	
		Exclusão	Inclusão
C (DN)*	13	4 (0,308)	9 (0,692)
OB (DH)*	13	3 (0,231)	10 (0,769)
C+Los (DN+Los)*	13	3 (0,231)	10 (0,769)
OB+Los (DH+Los)*	13	3 (0,231)	10 (0,769)

(*) Origem do animal quanto aos subgrupos iniciais; teste de homogeneidade de Goodman; $p > 0,05$.

2.5. Perfil metabólico

Para avaliar se a obesidade induziu alterações no metabolismo glicêmico e lipidêmico e se a combinação da condição biométrica com losartan afetou este comportamento, os animais foram submetidos ao teste de tolerância à glicose e às análises de glicemia e lipídemia de jejum. Os procedimentos *in vivo* foram conduzidos em dois momentos, na 30^a e na 35^a semana de experimentação. A caracterização lipidêmica e glicemia basal, obtidos em jejum, foram processadas ao final do protocolo, isto é, concluídas 35 semanas experimentais.

2.5.1. Teste de tolerância à glicose

Como conduta padrão, após jejum de 12 horas, amostras sanguíneas provenientes da artéria caudal foram utilizadas para a mensuração glicêmica na condição basal. Em seguida, procedeu-se a administração intraperitoneal de glicose a 20% (Glicose Monohidratada, Merck, São Paulo, Brasil), em dosagem equivalente a 2 g/kg ⁽⁷²⁾. Os níveis glicêmicos foram então avaliados no decorrer de 30, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos ⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾. O aparelho utilizado foi o glicosímetro ACCU-CHEK GO KIT (Roche Diagnostic Brazil Ltda, SP, Brazil).

2.5.2. Glicemia e lipidemia

Para explorar se a combinação entre obesidade e losartan promoveu alterações de glicemia e lipidemia, foram analisados os níveis séricos de glicose, lipoproteínas de alta (HDL) e baixa densidade (LDL), colesterol total, triglicérides e ácidos graxos não-esterificados (NEFA). Concluídos os procedimentos de análise *in vivo*, os animais foram mantidos em jejum por um período de 12 a 15 horas, submetidos à anestesia intraperitoneal com pentobarbital sódico (50 mg/kg) e eutanasiados por decapitação. Amostras sanguíneas foram coletadas, centrifugadas (3000 rpm) e armazenadas a -80 °C. Posteriormente, foram avaliadas as concentrações séricas de glicose, triglicérides, colesterol total, HDL, LDL e glicose, por método enzimático com kits específicos (Kovalent diagnosis, Kovalent do Brasil Ltda., Rio de Janeiro/RJ) ⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾. Os níveis de NEFA foram obtidos, utilizando-se de um kit colorimétrico (WAKO NEFA-C, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) ⁽⁷³⁾.

2.6. Perfil endócrino

Para analisar se a condição biométrica se associou com modificações dos níveis de insulina e leptina e, em adição, se o bloqueio de receptores AT₁ amortizou esses efeitos, foram avaliadas frações séricas desses dois indicadores hormonais. Concluída a coleta sanguínea pós-eutanásia, as concentrações de leptina e insulina foram determinadas por ELISA com auxílio de leitor de micro-placa (Spectra MAX 190, Molecular Devices, USA), e kits apropriados (Linco Research Inc., St. Louis, MO, USA) ⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾.

Ademais, para investigar alterações no metabolismo de insulina, quanto à captação de glicose, considerou-se o índice de resistência insulinêmica (HOMA - *homeostatic model assessment*) ^(74, 75), o qual relaciona mensurações sistêmicas de glicose e insulina pós-jejum. Este cálculo foi realizado pela fórmula: $[Glicose\ (mg/dl) \times Insulina\ (ng/ml)]/405$ ^(74, 75).

Para investigar a atividade do SRA nas diferentes condições biométricas e o impacto da administração de um antagonista de AT₁ sobre a mesma, procedeu-se com a avaliação sistêmica da atividade da ECA. A atividade sérica da ECA foi determinada utilizando-se de derivados de Abz-FRK(Dnp)P-OH como substrato e mensurações contínuas de fluorescência, em conformidade com os métodos já estabelecidos ^(76, 77). Os ensaios foram realizados à 37°C, em solução tampão de 0,1 M Tris-HCl, pH 7,0, contendo 50 mM de NaCl e 10μM de ZnCl₂. A taxa de hidrólise dos substratos intramoleculares fluorogênicos Abz-YRK-p (DNP) (10 mM) incubados com alíquotas de soro por 30 min a 37 °C foi avaliada para a obtenção da atividade enzimática da ECA. Incrementos de fluorescência ao longo do tempo foram registrados sob a razão de 420 nm de emissão por 320 nm de excitação. A atividade da ECA foi expressa como unidades arbitrárias de fluorescência (UAF)·min⁻¹·mg⁻¹×1000. Todos os procedimentos analíticos foram realizados no Laboratório de Bioquímica da Escola de Educação Física e Esporte - Universidade de São Paulo, São Paulo/SP.

2.7. Perfil cardiovascular *in vivo*

Para verificar a influência da combinação da condição biométrica e losartan sobre o comportamento cardiovascular *in vivo*, foram realizadas análises da pressão arterial sistólica (PAS), por meio de pletismografia, e estudo da morfologia e função ventricular, mediante ecocardiograma.

2.7.1. Pressão arterial sistólica

A PAS foi aferida indiretamente por meio de pletismografia caudal ⁽⁷⁸⁾, a partir de um electro-sphygmomanometer Narco Bio-System®, modelo 709-0610 (International Biomedical, Inc, USA). Como procedimento padrão, para promover vasodilatação da artéria

caudal, os animais foram inicialmente submetidos a um aquecimento à temperatura de 40° C durante 5 minutos, no interior de uma caixa de madeira (50cm×40cm), preenchida com maravalhas autoclavadas. Um manguito foi ajustado em torno da cauda e conectado a um transdutor de pulso. Posteriormente, realizou-se insuflação seguida da desinsuflação até que as pulsações arteriais fossem registradas em polígrafo Gould, modelo RS 3200 ⁽⁷⁸⁾. As mensurações pressóricas foram tomadas em dois momentos: após a 30ª e a 35ª semanas de experimentação.

2.7.2. Análise da morfologia e função cardíaca

A análise ecocardiográfica foi realizada após a 35ª semana experimental. Como conduta padrão, os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (50 mg/kg/IP; Dopalen®, Sespo Indústria e Comércio Ltda – Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilazina (1,0 mg/kg/IP; Anasedan®, Sespo Indústria e Comércio Ltda – Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil). Na sequência, foi realizada tricotomia na região anterior do tórax e os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo para realização do ecocardiograma. O ecocardiógrafo utilizado foi o modelo Phillips® HDI 5000 (Phillips Electronics North America Corporation, New York, USA), equipado com transdutor eletrônico de 12 MHz de frequência. Para a mensuração das estruturas cardíacas, foram obtidas imagens em modo monodimensional (modo-M) com o feixe de ultrassom orientado pelas imagens em modo bidimensional, estando o transdutor em posição paraesternal eixo menor. A imagem do ventrículo esquerdo (VE) foi obtida posicionando o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral no nível dos músculos papilares ⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾. Já as imagens da aorta e do átrio esquerdo foram obtidas com o cursor do modo-M posicionado ao nível do plano da valva aórtica.

As imagens obtidas foram registradas em impressora modelo UP-890 da Sony Co. Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas, manualmente, com o auxílio de um paquímetro. No momento em que o diâmetro da cavidade ventricular fosse máximo, foram

mensurados o diâmetro diastólico do VE (DDVE) e as espessuras diastólicas da parede posterior do VE (EDPP) e do septo interventricular (EDSIV). Quando o diâmetro da cavidade fosse mínimo, foram avaliados o diâmetro sistólico (DSVE) e as espessuras sistólicas da parede posterior (ESPP) e do septo interventricular (ESSIV). O átrio esquerdo (AE) foi medido no momento em que seu diâmetro fosse máximo. A massa do VE (MVE) foi calculada de acordo com a fórmula: $MVE = [(DDVE + EDPP + EDSIV)^3 - (DDVE)^3] \times 1,04$; e as seguintes variáveis foram derivadas das dimensões acima descritas: espessura relativa do VE ($2 \times EDPP / DDVE$), relações DDVE/PC e AE/MC, e índice de MVE (IMVE, MVE / MC). A função sistólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: porcentagem de encurtamento mesocárdico (% Enc. Meso) = $[(DDVE + \frac{1}{2}EDPP + \frac{1}{2}EDSIV) - (DSVE + \frac{1}{2}ESPP + \frac{1}{2}ESSIV)] / (DDVE + \frac{1}{2}EDPP + \frac{1}{2}EDSIV)$; porcentagem de encurtamento endocárdico (% Enc. Endo) = $[(DDVE - DSVE) / DDVE]$; velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP). A função diastólica foi analisada pelos índices de razão entre os picos de velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral (E/A), tempo de desaceleração da onda E (TDE) e tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV).

2.8. Perfil cardiovascular *post-mortem*

Para conferir se a obesidade se associou com indícios de remodelação cardíaca e se o antagonismo de AT_1 reverteu estes efeitos, foram conduzidas análises morfológicas estruturais nos aspectos macro e microscópico, e composição de miosinas de cadeias pesadas (MHC). Em adição, para investigar o papel do acionamento de receptores AT_1 na determinação de remodelação e resistência à insulina miocárdica, foram analisadas a expressão de angiotensina, *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), *c-Jun N-terminal kinases* (JNK) e dos seguintes peptídeos da via insulínica: receptor de insulina (βRI) e *phosphatidil inositol 3 quinase* (PI3K).

2.8.1. Análise morfológica macroscópica

A caracterização morfológica macroscópica abrangeu a análise das seguintes variáveis: massa cardíaca total (MCT), massa dos átrios (MA), massa do ventrículo direito (MVD) e esquerdo (MVE) e respectivas relações entre essas variáveis e a massa corporal final (MCF) e o comprimento da tibia. O estudo histológico envolveu mensurações morfométricas de cardiomiócitos e da matriz extracelular. Os procedimentos de coloração e leitura das lâminas histológicas são detalhados na sequência.

2.8.2. Análise morfológica microscópica do tecido cardíaco

Os procedimentos para confecção de lâminas histológicas procederam de métodos previamente utilizados em estudos prévios^(48-52, 79). As preparações histológicas foram realizadas no Laboratório Experimental de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Após toracotomia mediana e remoção cardíaca, amostras da parede anterior do ventrículo esquerdo foram retiradas a partir de incisão transversal a seis mm do ápice. Como procedimento de fixação, os fragmentos foram imersos em solução tamponada de formol a 10%, na qual foram mantidos por 48 horas. A seguir, cada fragmento miocárdico foi banhado em água corrente por 24 horas e imersos em solução de etanol a 70%, onde foram mantidos por mais 48 horas. Após a etapa de fixação, os materiais foram inclusos em blocos de parafina.

Cortes histológicos de 7 μ m de espessura foram coletados em lâminas histológicas e corados com solução de hematoxilina-eosina para a avaliação morfométrica de cardiomiócitos. Similarmente, lâminas contendo secções teciduais de sete μ m de espessura foram submetidas à coloração com técnica de *picro-sirius red* (PSR). Para o cálculo morfométrico de áreas transversas celulares, um mínimo de 100 cardiomiócitos foi amostrado de cada animal. Como princípio de análise, estas células deveriam advir da camada subendocárdica ventricular

(48-51, 79). Para a avaliação morfométrica do núcleo, além da procedência celular, como condicionante analítica, foram consideradas organelas nucleares com formato elíptico e situadas no centro geométrico dos cardiomiócitos. Como variáveis de medidas do núcleo miocitário, foram tomadas a área elíptica e o volume elipsóide; para a estimativa volumétrica, considerou-se a fórmula: $V = \pi AB^2/6$; as medidas A e B consistiram, respectivamente, de mensurações do maior e menor diâmetro nuclear^(50, 80, 81).

As lâminas coradas por PSR foram utilizadas para a quantificação do conteúdo de colágeno do meio intersticial miocárdico, avaliado por meio de videodensitometria. Retidas as imagens, os componentes do tecido cardíaco foram identificados, segundo a cor realçada. Os filamentos de colágeno refletiram a cor vermelha enquanto os miócitos revelaram a coloração amarela. A fração intersticial de colágeno envolveu a medida relativa (%) do conteúdo de colágeno sob toda a extensão tecidual. Um mínimo de 20 campos foi utilizado e regiões perivasculares foram desconsideradas.

Como instrumental analítico, os cortes histológicos foram projetados em aumento de 40 vezes com o auxílio de microscópio, LEICA DM LS, acoplado a uma câmera de vídeo que projeta imagens digitais em um microcomputador IBM, equipado com programa analisador de imagens. O cálculo de áreas miocitárias foi obtido com utilização do software *Image Pro-plus* (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA); para as demarcações morfométricas do núcleo, foram consideradas imagens digitais projetadas em um sistema computacional, equipado com programa *Scion Image* (Wayne Rasband at NIH, Bethesda MD, USA).

2.8.3. Análise das cadeias pesadas de miosina do miocárdio

A separação das isoformas de MHC do miocárdio foi realizada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida duodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)^(50, 51).

2.8.3.1. Processamento de amostras

Porções da parede anterior do ventrículo esquerdo (200-300µg) foram homogeneizadas em aparelho Polytron (Ika Ultra TurraxTM T25 Basic, Wilmington, USA) com tampão hipotônico de lise (fosfato de potássio 50 mM pH 7,0, sucrose 0,3 M, DTT 0,5 mM, EDTA 1 mM pH 8,0, PMSF 0,3 mM, NaF 10 mM e inibidor de fosfatase). O processo foi realizado três vezes durante 10 segundos a 4° C, com intervalos de 20 segundos. O produto da homogeneização foi centrifugado (Eppendorf 5804R, Hamburg, Germany) a 12000 rpm por 20 minutos a 4° C, e o sobrenadante transferido para tubos *eppendorfs* e armazenado em freezer – 80°C. A concentração de proteína foi determinada utilizando-se as curvas de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão ⁽⁸²⁾.

2.8.3.2. Preparação e composição de géis

A preparação e composição do gel de resolução (gel de corrida) procederam dos métodos de Talmadge e Roy ⁽⁸³⁾ e Reiser e Kline ⁽⁸⁴⁾, modificando-se a concentração de glicerol conforme Vescovo et al. ⁽⁸⁵⁾. O gel de poliacrilamida a concentração de 8% foi constituído por solução acrilamida/ bisacrilamida (30,8%), glicerol (37,5%), solução 1,5 M de Tris (pH 8,8), 10% de solução de duodecilsulfato de sódio (SDS), 10% de persulfato de amônio (APS) e 0,06 % de Temed. A etapa de polimerização do gel se estendeu por aproximadamente uma hora.

Similarmente, a preparação e composição do gel de empacotamento seguiram os métodos descritos por Talmadge e Roy ⁽⁸³⁾ e Reiser e Kline ⁽⁸⁴⁾. O gel de poliacrilamida a 4% foi composto por solução de acrilamida/ bisacrilamida (30,8%), água deionizada, 5% de glicerol, solução 1,5 M de Tris (pH 8,8), 10% de SDS, 10% APS e 0,06% de Temed. Este gel foi ministrado sobre o gel de resolução polimerizado. Concluída a polimerização do gel de empacotamento, uma solução de azul de bromofenol foi aplicada em cada poço, como marcador

da corrida eletroforética. A eletroforese foi executada em concentrações de 12 µg de proteína por amostra.

2.8.3.3. Eletroforese de proteínas cardíacas

O equipamento de eletroforese utilizado foi o modelo HOEFER SE600 (Pharmacia, Amersham Biosciences, USA), com espaçamento de 0,75 mm para aplicação dos géis. Inicialmente, as placas de vidro (16cm×18cm) a serem utilizadas na montagem da cuba foram asseadas com água e sabão neutro e esterilizadas com solução de etanol a 100%. A seguir, o conjunto foi disposto sobre superfície plana para secagem ao ar livre ⁽⁸⁶⁾.

A separação das isoformas de MHC foi efetuada sob corrente constante à voltagem de 70 volts ⁽⁸³⁾. Duas soluções tampões foram constituídas para a realização da corrida eletroforética: solução tampão superior, com 50 mM de Tris, 384 mM de glicina, pH 8,3, 0,2% SDS e 546 µl de 2-mercaptoetanol, e solução tampão inferior, que possuía a mesma composição, excetuando-se o acréscimo de 2-mercaptoetanol. Durante a execução do processo, a temperatura da solução tampão inferior foi mantida constante (20° C), com a utilização de um banho circulante de refrigeração (Modelo TE 2000, Tecnal® – São Paulo/SP, Brasil). Foi procedida a eletroforese de pequenas quantidades dos extratos (5-8 µl), em gel de resolução a 8% e gel de empacotamento a 4%, durante 40 horas de corrida a 70 V e, em seguida, corado com Coomassie Blue. Por fim, as isoformas de MHC foram identificadas de acordo com sua massa molecular, e a porcentagem relativa de cada tipo foi quantificada por densitometria.

Todos os procedimentos de análise das cadeias pesadas de miosina do miocárdio foram reproduzidos de dois estudos recentes vinculados ao nosso grupo de pesquisa ^(50, 51).

2.8.4. Avaliação da expressão de proteínas cardíacas

A expressão de proteínas envolvidas nas vias de sinalização principiadas pela Ang-II e insulina foi realizada pela técnica Western Blot seguindo as seguintes etapas: extração tecidual de proteínas, eletroforese em gel, transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose, identificação das proteínas por anticorpos específicos e quantificação das bandas por densitometria. A expressão dos peptídeos foi normalizada pela expressão da proteína constitucional *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH).

Inicialmente, fragmentos amostrais (80-100 mg) foram homogeneizados com 800 μ L de tampão de extração contendo NaCl 100 mM, TritonX-100 1% (v/v), desoxicolato de sódio 0,5% (w/v), SDS 0,1 % (w/v), glicerol 10% (v/v) Tris 10 mM (ph 7,4), EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, NaF 10 mM e inibidores de proteases (P2714, Sigma-Aldrich). A seguir, o homogenato foi centrifugado por 20 min, a 12000 rpm a 4° C, para eliminação de material insolúvel. O sobrenadante foi coletado e separado em alíquotas, que foram armazenadas a -80° C. Uma das alíquotas foi utilizada para quantificação de proteína pelo método de Bradford. Para cada proteína alvo, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida a 4° C (30 min a 50 V e 2 h a 120 V), com 50 μ g de proteína. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em sistema de transferência úmida por 90 min a 120 V, 4° C. A seguir, a membrana foi incubada em solução de leite desnatado 5 % em temperatura ambiente por duas horas para prevenir ligações inespecíficas com os anticorpos primário e secundário. Posteriormente, a membrana foi lavada com TBST (tampão contendo Tris, NaCl e Tween 20) e incubada durante a noite, a 4° C, com anticorpo primário específico. No dia subsequente, a membrana foi lavada com TBST e incubada a temperatura ambiente por 90 min com anticorpo secundário (conjugado a peroxidase) adequado para ligação com o anticorpo primário, de acordo com recomendação do fabricante. A seguir, a membrana foi incubada com Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce Protein Research

Products, Rockford, USA) para detecção do anticorpo ligado à membrana e foi obtida a auto-radiografia. Após obtenção do filme com as bandas referentes à proteína alvo, a membrana foi incubada com Restore Western Blot Stripping Buffer (Pierce Protein Research Products, Rockford, USA) para remoção dos anticorpos ligados à membrana. A seguir, foi realizado novamente o processo de bloqueio e a membrana foi incubada durante a noite, a 4° C, com anticorpo primário para a proteína constitutiva GAPDH (6C5, SC-32233, diluição 1:10000, Santa Cruz Biotechnology). O procedimento foi realizado da mesma forma como descrito anteriormente até a detecção do sinal e obtenção da auto-radiografia. Os filmes foram, então, escaneados e as bandas quantificadas por densitometria utilizando-se software específico ⁽⁸⁷⁾. Para avaliação dos mecanismos dependentes da ação da angiotensina II, foram utilizados anticorpos para detecção de angiotensina (SC-7419), ERK (SC-93) e JNK (SC-137019). Cabe realçar que o anticorpo SC-7419, demarca peptídeos precursores da Ang-II, como angiotensinogênio e angiotensina I, e Ang-III. Para análise dos peptídeos ativados pela ação da insulina, foram empregados anticorpos para expressão de subunidade β do RI (SC-711) e p85 do PI3K (SC-1637). Considerando-se a fosforilação em tirosina, foram também empregados anticorpos para expressão de subunidade β do RI fosforilada em resíduos de tirosina nas posições 1162 e 1163 (SC-25130) e p85 do PI3K fosforilada sobre em tirosina na posição 508 (SC-12929).

2.9. Procedimentos de análise estatística

A comparação da ingestão média de losartan foi realizada pelo teste t de Student para amostras independentes e a homogeneidade de permanência dos animais nos grupos de estudo pelo teste de homogeneidade de Goodman. O comportamento nutricional, perfil glicêmico e a pressão arterial sistólica avaliados em diferentes momentos de mensuração, foram analisados por meio da técnica de análise de variância para o esquema de dois fatores independentes no modelo de medidas repetidas complementada com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni ⁽⁸⁸⁾. As demais variáveis de estudo foram analisadas por meio da técnica da análise de variância para o esquema de dois fatores complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey, quando a variável mostrou aderência à distribuição gaussiana e, na ausência desta, por meio de técnica semelhante não paramétrica complementada com as comparações múltiplas de Dunn ⁽⁸⁹⁾. Todas as conclusões estatísticas foram tomadas considerando-se o nível de 5% de significância.

3. RESULTADOS

Na presente seção, são apresentados os resultados dos quatro grupos experimentais, constituídos pela combinação de dois fatores sob estudo: condição biométrica e medicação. Considerando-se os grupos sob losartan, abaixo são apresentados os valores médios de ingestão farmacológica diária, mostrando que a administração de losartan não foi afetada pela condição biométrica (Tabela 2).

Tabela 2. Média e desvio-padrão da ingestão diária de losartan (mg/Kg de massa corporal) segundo condição biométrica

Droga	Condição Biométrica	
	Controle (C+Los) (n=10)	Obeso (OB+Los) (n=10)
Losartan	32,6 ± 2,4	31,0 ± 4,1

Teste t de Student para amostras independentes; $p > 0,05$.

3.1. Caracterização nutricional e biométrica

Os atributos relacionados ao comportamento nutricional, como ingestão calórica, eficiência energética, consumo hídrico e também a evolução ponderal, analisados segundo a combinação de condição biométrica, medicação e momento de avaliação, são apresentados na Tabela 3. A adiposidade corporal é detalhada nas Figuras 5A e 5B. Sobre o comportamento alimentar, no período inicial de 30 semanas, os animais obesos consumiram menor quantidade de ração e água em relação às contrapartes controle. Embora a ingestão hídrica seja alterada com o progresso do período experimental, a ingestão calórica foi reduzida em todos os grupos experimentais, ao final da 35ª semana. Considerando-se a influência medicamentosa, não foram constatadas diferenças de consumo energético e hídrico entre grupos de condição biométrica similar (C vs. C+Los, $p > 0,05$; OB vs. OB+Los, $p > 0,05$; Tabela 3).

Tabela 3. Avaliação nutricional e biométrica segundo grupo e momento de avaliação

Variável	Momento	Grupo			
		C	OB	C+Los	OB+Los
IC (Kcal/g/dia)	30ª Semana	85,0 ± 3,4	67,4 ± 7,0 *	85,0 ± 5,6	69,4 ± 9,3 *
	35ª Semana	78,0 ± 4,8 #	66,6 ± 5,6 #	79,2 ± 4,6 #	63,8 ± 8,0 #
EE (×10 ² g/Kcal)	30ª Semana	1,32 ± 0,15	2,36 ± 0,34 *	1,35 ± 0,15	2,33 ± 0,28 *
	35ª Semana	-0,01 ± 0,42 #	-0,41 ± 0,67 #	-0,16 ± 0,66 #	-0,58 ± 0,95 #
IH (ml/dia)	30ª Semana	41,7 ± 4,4	36,6 ± 5,9 *	42,6 ± 7,6	37,5 ± 7,2 *
	35ª Semana	39,6 ± 3,7	35,9 ± 6,7 *	44,8 ± 5,0	38,0 ± 6,2 *
MC (g)	30ª Semana	552 ± 39	634 ± 45 *	554 ± 38	633 ± 62 *
	35ª Semana	553 ± 40	644 ± 45 *	552 ± 44	645 ± 63 *

Valores em média ± desvio-padrão; IC: ingestão calórica; EE: eficiência energética; IH: ingestão hídrica; MC: massa corporal; C: grupo controle; C+Los: grupo controle tratado com losartan; OB: grupo obeso; OB+Los: grupo obeso tratado com losartan; # p<0,05 para comparações entre momentos; * p<0,05 para comparações entre condições biométricas distintas; ANOVA e teste de Bonferroni.

Equiparada à ingestão calórica, a eficiência energética mostrou-se reduzida com o progresso do experimento em todos os grupos. Em geral, a obesidade se associou com maior eficiência energética, em concordância com estudos prévios de nosso grupo de pesquisa ⁽⁴⁸⁻⁵⁴⁾. Vale denotar o comportamento similar dessa variável na comparação entre grupos de condição biométrica similar (C vs. C+Los, p>0,05; OB vs. OB+Los, p>0,05; Tabela 3). Em associação com a maior eficiência energética, os grupos obesos apresentaram maior massa corporal comparados aos respectivos controles. Em especial, a intervenção medicamentosa não influenciou na condição ponderal dos grupos Los em comparação às respectivas contrapartes C e OB. Os grupos OB e OB+Los revelaram valores superiores de massa corporal já ao final do 2º ciclo experimental (10ª semana; dados não-apresentados).

No aspecto biométrico, a obesidade foi também caracterizada por valores superiores de adiposidade (C: 5,96 ± 1,02% vs. OB: 11,96 ± 2,31%; p<0,05; C+Los: 6,44 ± 1,31 vs. OB+Los: 11,34 ± 2,26, p<0,05) e Índice de Lee (C: 6,29 ± 0,45 vs. OB: 7,51 ± 0,46; p<0,05; C+Los: 6,33 ± 0,45 vs. OB+Los: 7,42 ± 0,58, p<0,05) em relação aos grupos controle (Figuras

5A e 5B). Em conformidade com o observado na massa corporal, a intervenção farmacológica não afetou esses indicadores biométricos.

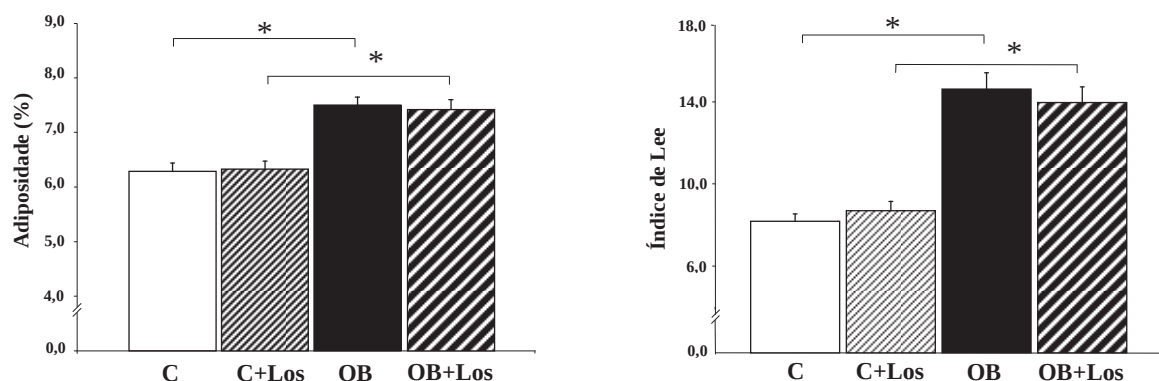


Figura 5. Média e erro-padrão da (A) adiposidade (%) e (B) Índice de Lee: massa corporal ($\text{g}^{1/3}$)/comprimento naso-anal (cm), segundo o grupo; C: grupo controle; C+Los: grupo controle tratado com losartan; OB: grupo obeso; OB+Los: grupo obeso tratado com losartan; * $p < 0,05$ para comparações entre condições biométricas distintas; ANOVA e teste de Tukey; $p < 0,05$.

3.2. Perfil Metabólico

3.2.1. Comportamento glicêmico

Na Tabela 4, são expostos os resultados de glicemia, levando-se em conta a área sob a curva de respostas obtidas no teste de tolerância à glicose. Em ambos os momentos avaliados, a obesidade, isoladamente, foi caracterizada por menor tolerância à glicose. Entretanto, a administração de losartan amenizou as diferenças atinentes à condição biométrica, não se constatando alterações entre C+Los e OB+Los na 35ª semana ($p > 0,05$). Ademais, enquanto os grupos não-tratados C e OB mostraram redução da tolerância à glicose da 30ª à 35ª semana, os grupamentos sob losartan revelaram manutenção do comportamento glicêmico no decorrer do tratamento, evidenciando interação entre medicação e momento de avaliação.

Tabela 4. Comportamento da área sob a curva de tolerância glicêmica, segundo condição biométrica, medicação e momento de avaliação

Grupo	Momento	
	30 semanas	35 semanas
C	23792±1290	26345±1935 †
OB	29484±1224 *	34841±1836 *†
C+Los	23267±1224	26520±1836
OB+Los	29982±1224 *	31300±1836

Valores em média ± desvio-padrão; C: grupo controle; C+Los: grupo controle tratado com losartan; OB: grupo obeso; OB+Los: grupo obeso tratado com losartan; * $p < 0,05$ para comparações entre condições biométricas distintas; † $p < 0,05$ para comparações entre momentos; ANOVA, modelo de medidas repetidas, e teste de Bonferroni.

3.2.2. Caracterização bioquímica: glicemia e lipidemia

Na Tabela 5, são apresentadas as respostas séricas concernentes à caracterização bioquímica. Menor tolerância glicêmica, confirmada no grupo OB (Tabela 4), manteve-se associada com maiores índices de glicose ($p > 0,05$). Nota-se, em especial, que a intervenção com losartan amortizou estes efeitos na obesidade, evidenciando interação entre os dois fatores de estudo (Tabela 5).

Considerando-se o perfil lipidêmico, os valores de HDL, LDL e proteína total não foram alterados pelos fatores estudados. Sob losartan, NEFA, triglicérides e albumina, elevados nos obesos não-tratados, mostraram-se inalterados pela condição biométrica (OB+Los vs. C+Los, $p > 0,05$). Diferentemente, a obesidade esteve relacionada com aumento da concentração sérica de colesterol total, o que se evidenciou nos dois níveis de comparação (Tabela 5).

Tabela 5. Perfil glicêmico e lipidêmico sérico segundo condição biométrica e medicação

Variáveis	Grupo	Medicação	
		Ausente	Presente (Los)
Glicose (mg/dL)	C	126,8 ± 21,3	139,9 ± 15,9
	OB	145,3 ± 22,6	102,3 ± 16,6 * #
NEFA (ng/dL)	C	0,32 ± 0,03	0,41 ± 0,04 #
	OB	0,44 ± 0,08 *	0,39 ± 0,07 #
Colesterol Total (mg/dL)	C	100,1 ± 21,1	113,3 ± 10,9 #
	OB	122,2 ± 7,7 *	125,6 ± 12,1 *
HDL (mg/dL)	C	37,6 ± 4,5	38,6 ± 3,2
	OB	41,3 ± 7,1	41,3 ± 5,1
LDL (mg/dL)	C	20,3 ± 4,3	22,1 ± 2,8
	OB	20,7 ± 4,3	23,3 ± 2,3
Triglicérides (mg/dL)	C	94,7 ± 28,0	96,1 ± 19,4
	OB	121,8 ± 35,4 *	102,3 ± 16,6
Proteína Total (g/dL)	C	6,1 ± 0,3	6,0 ± 0,3
	OB	6,3 ± 0,2	6,1 ± 0,3
Albumina (g/dL)	C	2,7 ± 0,1	2,7 ± 0,1
	OB	2,9 ± 0,1 *	2,8 ± 0,1

Valores em média ± desvio padrão; NEFA: ácidos graxos não-esterificados; HDL: lipoproteínas de alta densidade; LDL: lipoproteínas de baixa densidade; C: grupo controle; C+Los: grupo controle, tratado com losartan; OB: grupo obeso; OB+Los: grupo obeso tratado com losartan; * p<0,05 para comparações entre condições biométricas distintas; # p<0,05 para comparações relacionadas a vigência de medicação; ANOVA e teste de Tukey.

3.3. Perfil endócrino

Subsequentemente, são ilustrados registros gráficos da insulinemia, índice HOMA, leptinemia e atividade da ECA (Figura 6A-6D). No estado não-medicado, a condição biométrica relacionou-se com valores superiores de insulinemia (Figura 6A), índice HOMA (Figura 6C), hiperleptinemia (Figura 6B) e exacerbada atividade da ECA (Figura 6D; p>0,05) na obesidade. Sob losartan, o metabolismo insulinêmico, pautado na insulinemia e HOMA, apresentou-se amenizado em ambos os grupos medicados, embora as diferenças derivadas da

condição biométrica tenham persistido entre C+Los e OB+Los (Figura 6A). Em adição, o bloqueio de receptores AT_1 não causou alterações significativas sobre os níveis de leptina (Figura 6B).

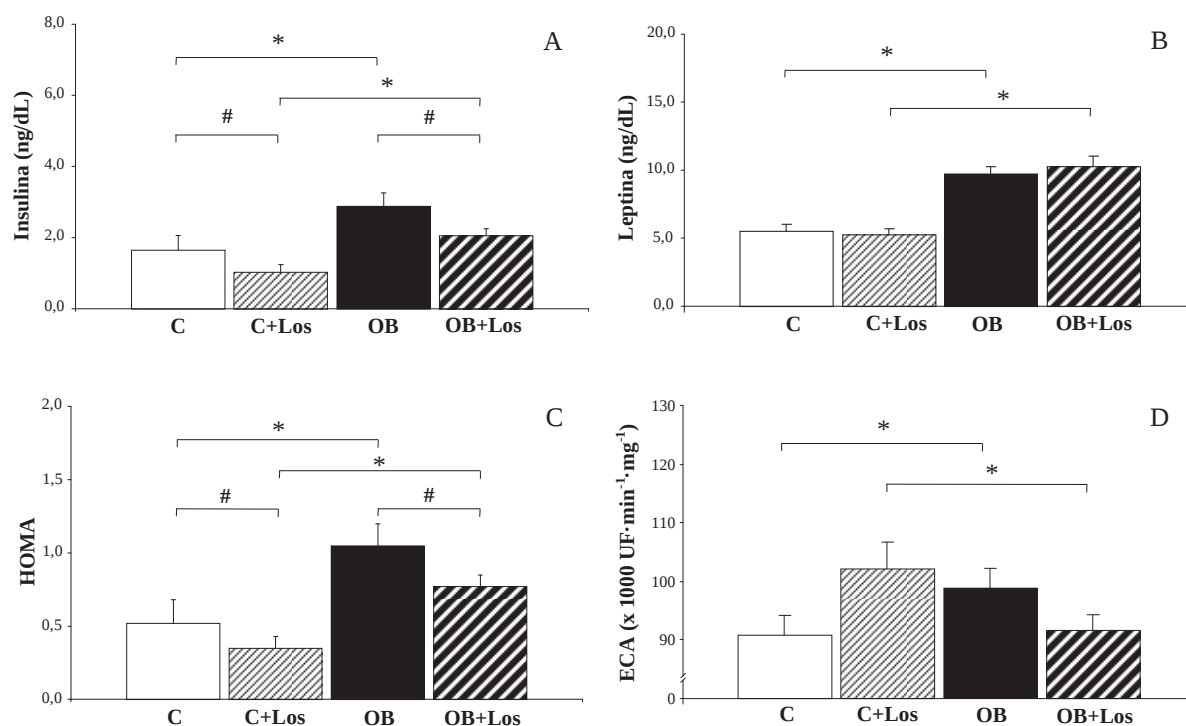


Figura 6. Concentrações séricas de (A) insulina e (B) leptina; (C) HOMA (*homeostatic model assessment*)= glicose (mg/dL)×insulina (ng/dL)/ 405; (D) atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA), segundo condição biométrica e medicação; C: grupo controle; C+Los: grupo controle tratado com losartan; OB: grupo obeso; OB+Los: grupo obeso tratado com losartan; valores em média e erro-padrão; * p<0,05 para comparações entre condições biométricas distintas; # p<0,05 para comparações relacionadas a vigência de medicação; ANOVA, complementada com teste de Tukey.

Os resultados da atividade da ECA revelaram interação significativa entre condição biométrica e medicação. Na ausência de tratamento, a obesidade mostrou-se associada com maior formação de angiotensina II (p>0,05); a administração de losartan ocasionou aumento da atividade da ECA na condição controle (grupos C) e redução da mesma no grupo obeso (Figura 6C e 6D).

3.4. Perfil cardiovascular *in vivo*

Na Tabela 6, são mostrados os resultados da pressão arterial sistólica, segundo condição biométrica, medicação e momento de avaliação. Nos dois instantes de análise, não foram constatados efeitos pressóricos significativos advindos da circunstância biométrica. Sob losartan, ambos os grupos tratados exibiram menores índices de pressão arterial sistólica em relação às contrapartes não-medicadas.

Tabela 6. Comportamento da pressão arterial sistólica (mmHg) segundo condição biométrica, medicação e momento de avaliação

Grupo	Momento	
	30 semanas	35 semanas
Controle	116 ± 11	115 ± 4
Controle+Losartan	119 ± 8	109 ± 8 †#
Obeso	121 ± 12	124 ± 10
Obeso+Losartan	123 ± 8	112 ± 14 †#

Valores em média ± desvio-padrão; # p<0,05 para comparações relacionadas a vigência de medicação; † p<0,05 para comparações entre momentos; ANOVA, modelo de medidas repetidas, e teste de Bonferroni.

A seguir, são mostrados os resultados hemodinâmicos e estruturais do coração, obtidos por meio do ecocardiograma (Tabela 7). Nos dois níveis de tratamento, a obesidade manteve-se relacionada com menores valores de AE/MC, DDVE/MC e IMVE, calculados a partir de relações com a massa corporal final. Sob influência farmacológica, a frequência cardíaca mostrou-se ampliada enquanto as variáveis EDPP, EDSIV e ESSIV revelaram-se amortizadas em ambas as categorias biométricas. Levando-se em conta a interação entre condição biométrica e medicação, a condição biométrica se associou com hipertrofia do ventrículo esquerdo, evidenciada por ampliações concomitantes de EDPP, EDSIV e ERelVE no grupo OB em comparação ao C. Contudo, com losartan, essas variáveis morfológicas revelaram-se inalteradas entre os grupos C+Los e OB+Los (Tabela 7).

Tabela 7. Avaliação ecocardiográfica do ritmo contrátil e da estrutura cardíaca segundo condição biométrica e medicação

Variável	Grupo	Medicação	
		Ausente	Presente (Los)
FC (bpm)	C	262 ± 61	312 ± 57 #
	OB	270 ± 51	306 ± 42 #
AE (mm)	C	5,51 ± 0,67	5,42 ± 0,88
	OB	5,54 ± 0,24	5,29 ± 0,34
AE/MC (mm/Kg)	C	9,92 ± 1,17	9,96 ± 1,96
	OB	8,63 ± 0,80 *	8,34 ± 0,70 *
DDVE (mm)	C	8,43 ± 0,71	8,47 ± 0,42
	OB	8,20 ± 0,40	8,35 ± 0,46
DDVE/ MC (mm/Kg)	C	15,19 ± 1,28	15,51 ± 1,48
	OB	12,75 ± 1,04 *	13,16 ± 1,02 *
DSVE (mm)	C	4,58 ± 0,46	4,57 ± 0,39
	OB	4,10 ± 0,48 *	4,38 ± 0,36
EDPP (mm)	C	1,51 ± 0,04	1,46 ± 0,06 #
	OB	1,58 ± 0,09 *	1,53 ± 0,08 #
EDSIV (mm)	C	1,53 ± 0,04	1,47 ± 0,06 #
	OB	1,59 ± 0,08 *	1,54 ± 0,08 #*
ESPP (mm)	C	2,67 ± 0,16	2,61 ± 0,36
	OB	2,72 ± 0,28	2,72 ± 0,30
ESSIV (mm)	C	2,58 ± 0,52	2,32 ± 0,18 #
	OB	2,40 ± 0,15	2,27 ± 0,13 #
ERelVE	C	0,36 ± 0,03	0,35 ± 0,02
	OB	0,39 ± 0,02 *	0,37 ± 0,03
IMVE (g/Kg)	C	1,71 ± 0,20	1,67 ± 0,19
	OB	1,49 ± 0,22 *	1,49 ± 0,15 *

Valores em média ± desvio padrão; FC: frequência cardíaca; AE: diâmetro do átrio esquerdo; AE/ MC: razão entre AE e massa corporal; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DDVE/MC: razão entre o DDVE e MC; DSVE: diâmetro sistólico do VE; EDPP: espessura diastólica da parede posterior; EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular; ESPP: espessura sistólica da parede posterior; ESSIV: espessura sistólica do septo interventricular; ERelVE: espessura relativa da parede do VE; IMVE: índice de massa do ventrículo esquerdo (VE); * p<0,05 para comparações entre condições biométricas distintas; # p<0,05 para comparações relacionadas a vigência de medicação; ANOVA, complementada com teste de Tukey.

Na Tabela 8, são apresentadas informações sobre a função ventricular sistólica e diastólica, obtidas pela análise ecocardiográfica. A condição biométrica, isoladamente, mostrou-se associada com desempenho sistólico ampliado, evidenciado por medidas superiores de VEPP, fração de ejeção, encurtamento endocárdico e mesocárdico no grupo OB em relação ao C. Na vigência de losartan, somente a variável VEPP manteve-se diferente entre os grupos C+Los e OB+Los; as demais respostas mostraram-se similares entre os grupamentos +Los, reiterando a interação entre condição biométrica e medicação.

Considerando-se a função ventricular diastólica, onda E do fluxo transmitral revelou-se aumentada, enquanto TRIV, em valores absolutos e relacionados com R-R, apresentaram-se diminuídos no grupo OB. Com exceção da onda E, inalterada entre os grupos +Los, demais achados se mantiveram nos dois níveis de tratamento. Levando-se em conta somente a influência farmacológica, as variáveis TRIV, E/A e intervalo R-R foram reduzidas na presença da medicação (Tabela 8).

Tabela 8. Avaliação ecocardiográfica do desempenho sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo segundo condição biométrica e medicação

Variável	Grupo	Medicação	
		Ausente	Presente (Los)
Enc. Endocárdico (%)	C	45,8 ± 2,3	46,0 ± 4,1
	OB	50,1 ± 4,0 *	47,4 ± 4,2
Enc. Mesocárdico (%)	C	27,5 ± 3,4	29,1 ± 3,2
	OB	32,0 ± 2,3 *	30,3 ± 2,7
VEPP (mm/s)	C	34,1 ± 3,0	33,6 ± 2,8
	OB	38,4 ± 3,9 *	37,9 ± 4,3 *
Fração de Ejeção	C	0,84 ± 0,02	0,84 ± 0,03
	OB	0,87 ± 0,03 *	0,85 ± 0,03
E mitral (cm/s)	C	75,6 ± 10,4	75,0 ± 11,0
	OB	83,3 ± 9,2 *	79,2 ± 5,4
A mitral (cm/s)	C	55,1 ± 20,5	68,6 ± 18,8
	OB	56,8 ± 15,5	59,9 ± 15,4
E/ A	C	1,62 ± 0,32	1,18 ± 0,41 #
	OB	1,58 ± 0,16	1,39 ± 0,32 #
TDE (ms)	C	49,5 ± 4,2	55,5 ± 2,1
	OB	50,7 ± 8,5	48,4 ± 8,1
TRIV (ms)	C	36,3 ± 4,1	31,5 ± 4,1 #
	OB	31,2 ± 3,5 *	28,5 ± 2,6 *#
R-R (ms)	C	0,24 ± 0,06	0,18 ± 0,02 #
	OB	0,23 ± 0,04	0,20 ± 0,02 #
TRIV/R-R	C	75,3 ± 12,9	73,6 ± 7,6
	OB	65,8 ± 8,7 *	64,0 ± 4,0 *

Valores em média ± desvio padrão; Enc. Endocárdico: fração relativa de encurtamento endocárdico; Enc. Mesocárdico: fração relativa de encurtamento mesocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior; E mitral: onda E do fluxo transmitral; A mitral: onda A do fluxo transmitral; E/ A: razão entre ondas E e A; TDE: tempo de desaceleração da onda E; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico do VE. C: grupo controle; C+Los: grupo controle tratado com losartan; OB: grupo obeso; OB+Los: grupo obeso tratado com losartan; * p<0,05 para comparações entre condições biométricas distintas; # p<0,05 para comparações relacionadas a vigência de medicação; ANOVA e teste de Tukey.

3.5. Perfil cardiovascular *post-mortem*

3.5.1. Caracterização morfológica macro e microscópica do miocárdio

As análises morfológicas macro e microscópica do coração são expostas, respectivamente, na Tabela 9 e na Figura 7A-D. Considerando-se a morfologia macroscópica, as variáveis MA, MA/Tíbia e MVD/Tíbia não foram alteradas pelos fatores estudados. Contudo, quando relacionadas com a massa corporal, as mensurações ponderais MA, MVD e MVE revelaram-se diminuídas em ambos os grupos obesos. Nas duas condições biométricas, a administração de losartan ocasionou reduções nas variáveis MVD/MCF, MVE, MVE/MCF e MVE/Tíbia; em contrapartida, a medicação acarretou diminuição da massa de VD somente no grupo C+Los (Tabela 9).

Tabela 9. Avaliação morfológica do coração segundo condição biométrica e medicação

Variável	Condição	Medicação	
		Ausente	Presente (Los)
Átrios (g)	C	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01
	OB	0,12 ± 0,02	0,11 ± 0,02
MA/MCF (mg/g)	C	0,21 ± 0,02	0,19 ± 0,02
	OB	0,18 ± 0,02 *	0,18 ± 0,02 *
MA/Tíbia (g/m)	C	2,43 ± 0,28	2,21 ± 0,17
	OB	2,54 ± 0,37	2,39 ± 0,45
MVD (g)	C	0,27 ± 0,03	0,24 ± 0,02 #
	OB	0,26 ± 0,02	0,26 ± 0,03
MVD/MCF (mg/g)	C	0,50 ± 0,03	0,46 ± 0,05 #
	OB	0,43 ± 0,03 *	0,42 ± 0,03 #*
MVD/Tíbia (g/m)	C	5,76 ± 0,53	5,23 ± 0,54
	OB	5,80 ± 0,48	5,78 ± 0,69
MVE (g)	C	0,85 ± 0,08	0,79 ± 0,05 #
	OB	0,89 ± 0,07 †	0,78 ± 0,07 #
MVE/MCF (mg/g)	C	1,58 ± 0,06	1,50 ± 0,10 #
	OB	1,42 ± 0,10 *	1,26 ± 0,08 #*
MVE/Tíbia (g/m)	C	18,3 ± 1,3	17,2 ± 1,0 #
	OB	19,3 ± 1,4	17,1 ± 1,4 #

Valores em média ± desvio padrão; MA/MCF: razão entre massa dos átrios e massa corporal final; MVD: ventrículo direito; MVD/MCF: razão entre MVD e MCF; MVE: ventrículo esquerdo; VE/MCF: razão entre MVE e MCF; C: grupo controle; C-Los: grupo controle, tratado com losartan; OB: grupo obeso; OB-Los: grupo obeso, tratado com losartan; * p<0,05 para comparações entre condições biométricas distintas; # p<0,05 para comparações relacionadas a vigência de medicação; ANOVA e teste de Tukey.

Quanto à análise microscópica morfométrica, a obesidade induziu aumento das dimensões celulares, associado a ampliações da área e volume do núcleo cardiomiocitário bem como do conteúdo intersticial de colágeno (Figura 7A-D). A administração de losartan, contudo, culminou em amortização dessas alterações. Esses efeitos farmacológicos foram evidenciados por menores valores de área celular (C: 269 ± 12 vs. C+Los: 292 ± 9 μm^2 , p>0,05; OB: 332 ± 23 vs. OB+Los: 290 ± 10 μm^2 , p<0,05; Figura 7A), área (C: 4,44 ± 0,25 vs. C+Los: 4,82 ± 0,29 μm^2 , p>0,05; OB: 9,97 ± 0,49 vs. OB+Los: 5,66 ± 0,33 μm^2 , p<0,001; Figura 7C) e volume (C:

$6,56 \pm 0,54$ vs. C+Los: $7,26 \pm 0,70 \mu\text{m}^2$, $p>0,05$; OB: $21,61 \pm 1,65$ vs. OB+Los: $9,32 \pm 0,81 \mu\text{m}^2$, $p<0,001$; Figura 7D) do núcleo cardiomiocitário no grupo OB+Los comparado ao OB.

Em referência a avaliação morfométrica intersticial, a condição biométrica mostrou-se associada com acúmulo extracelular de colágeno na obesidade. Entretanto, em analogia aos demais índices morfométricos, a administração de losartan atenuou a remodelagem intersticial em ambos os grupos tratados (C: $2,89 \pm 0,81$ vs. C+Los: $1,89 \pm 0,61$ %, $p<0,05$; OB: $4,81 \pm 0,41$ vs. OB+Los: $4,46 \pm 0,73$ %, $p<0,05$; Figura 7B).

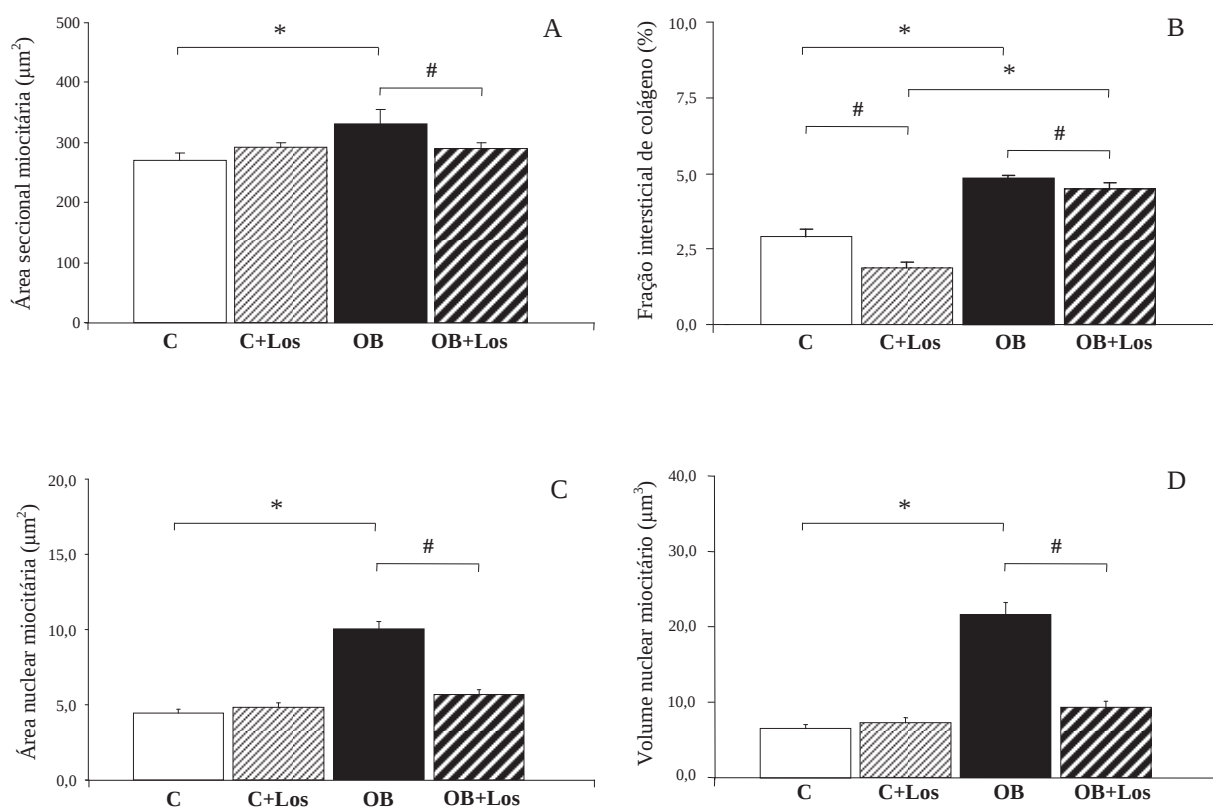


Figura 7. Avaliação morfométrica miocárdica; (A) área seccional cardiomiocitária, (B) fração intersticial de colágeno, (C) área e (D) volume do núcleo cardiomiocitário, segundo o grupo; C: grupo controle; C+Los: grupo controle tratado com losartan; OB: grupo obeso; OB+Los: grupo obeso tratado com losartan; valores em média $\pm$ erro-padrão; * $p<0,05$ para comparações entre condições biométricas distintas; # $p<0,05$ para comparações relacionadas a vigência de medicação; ANOVA e teste de Tukey.

3.5.2. Caracterização miocárdica de cadeias pesadas de miosina

Considerando-se a composição de cadeias pesadas de miosina (MHC), a remodelação cardíaca decorrente da condição biométrica foi também indicada por maior expressão de isoformas β -MHC. A relação β/α -MHC (C: $0,49 \pm 0,08$ vs. OB: $1,12 \pm 0,45$, $p < 0,001$; C+Los: $0,73 \pm 0,12$ vs. OB+Los: $1,16 \pm 0,32$, $p < 0,05$) e o conteúdo relativo de β -MHC (C: $33,0 \pm 3,5$ vs. OB: $51,1 \pm 9,8\%$, $p < 0,001$; C+Los: $41,8 \pm 3,8$ vs. OB+Los: $52,8 \pm 7,9$, $p < 0,01$) evidenciaram-se ampliados na obesidade. No entanto, contrastando com os demais indicadores de remodelação, o antagonismo de receptores AT_1 não se associou com reversão das adaptações de MHC (Figura 8A-C).

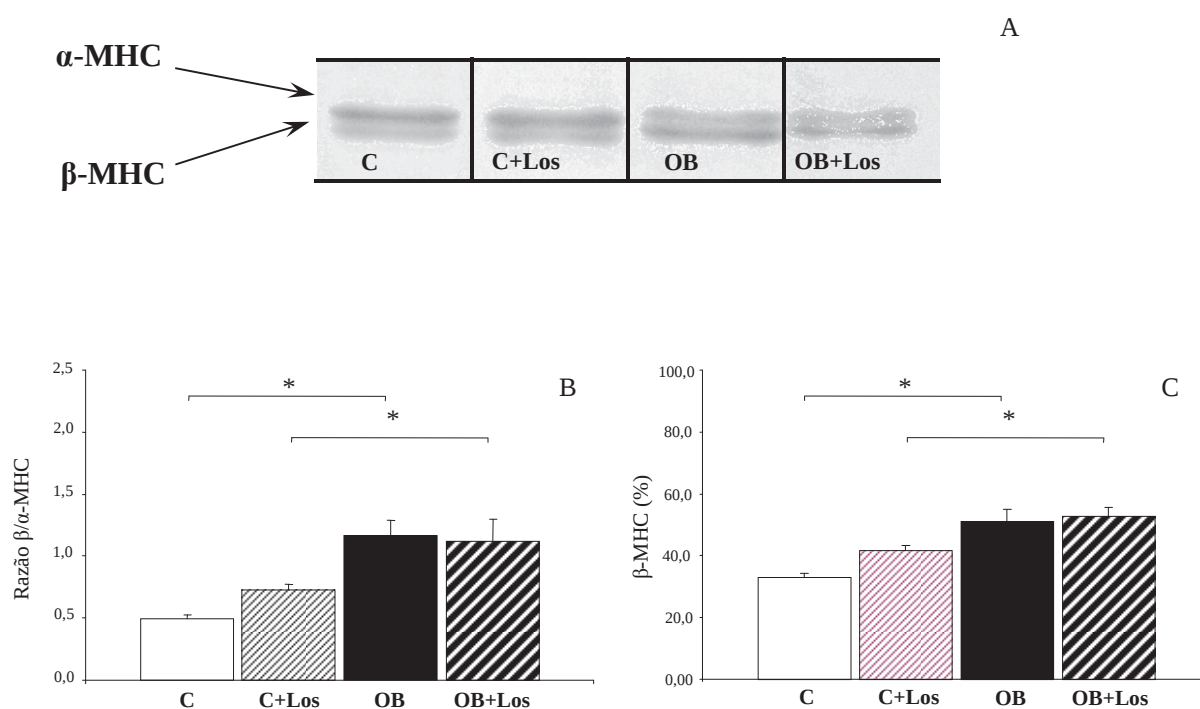


Figura 8. (A) Bandas correspondentes às isoformas α - e β - das cadeias pesadas de miosina (MHC) do miocárdio, segundo condição biométrica e medicação; (B) Razão entre as isoformas β e α -MHC e (C) composição relativa (%) da β -MHC do miocárdio, segundo o grupo; resultados analisados sob concentração amostral de 12 μ g de proteína; C: grupo controle; C+Los: grupo controle tratado com losartan; OB: grupo obeso; OB+Los: grupo obeso tratado com losartan; valores em média $\pm$ erro-padrão; * $p < 0,05$ para comparações entre condições biométricas distintas; ANOVA e teste de Tukey.

3.5.3. Caracterização molecular de proteínas cardíacas

Levando-se em conta que o losartan na dose de 30 mg/kg/d pode inibir a síntese endógena de angiotensina no miocárdio ^(10, 47), foi realizada a dosagem peptídica de angiotensina miocárdica, por meio de Western-Blot (Figura 9A). Para checar a participação de MAPK como carreadoras de cascatas de sinalização principiadas pelo acionamento de receptores AT₁, avaliou-se a expressão molecular das proteínas ERK e JNK (Figura 9B e 9C).

Na ausência de tratamento, os animais obesos apresentaram menores índices miocárdicos de angiotensina (C: $1,00 \pm 0,09$ vs. OB: $0,66 \pm 0,11$ UA; $p < 0,05$) e de expressão de JNK (C: $1,00 \pm 0,07$ vs. OB: $0,55 \pm 0,06$; $p < 0,05$) em relação às contrapartes controle. Em contraste, o grupo OB reportou maior expressão de ERK (C: $1,00 \pm 0,13$ vs. OB: $1,73 \pm 0,05$ UA; $p < 0,05$) comparado ao grupo C. Com relação à influência do losartan, a intervenção medicamentosa reduziu os níveis de angiotensina nas duas condições biométricas, comprovando a inibição da atividade do SRA no miocárdio pela ação da medicação (C+Los: $0,62 \pm 0,04$ vs. OB+Los: $0,56 \pm 0,10$; $p > 0,05$). Considerando-se as MAPK, o fármaco mostrou amortizar a expressão de ERK (C+Los: $1,07 \pm 0,07$ vs. OB+Los: $1,23 \pm 0,20$ UA; $p > 0,05$) e ampliar a expressão molecular de JNK (C+Los: $0,74 \pm 0,13$ vs. OB+Los: $0,87 \pm 0,17$ UA; $p > 0,05$), normalizando a ativação dessas proteínas na obesidade (Figura 9A-C).

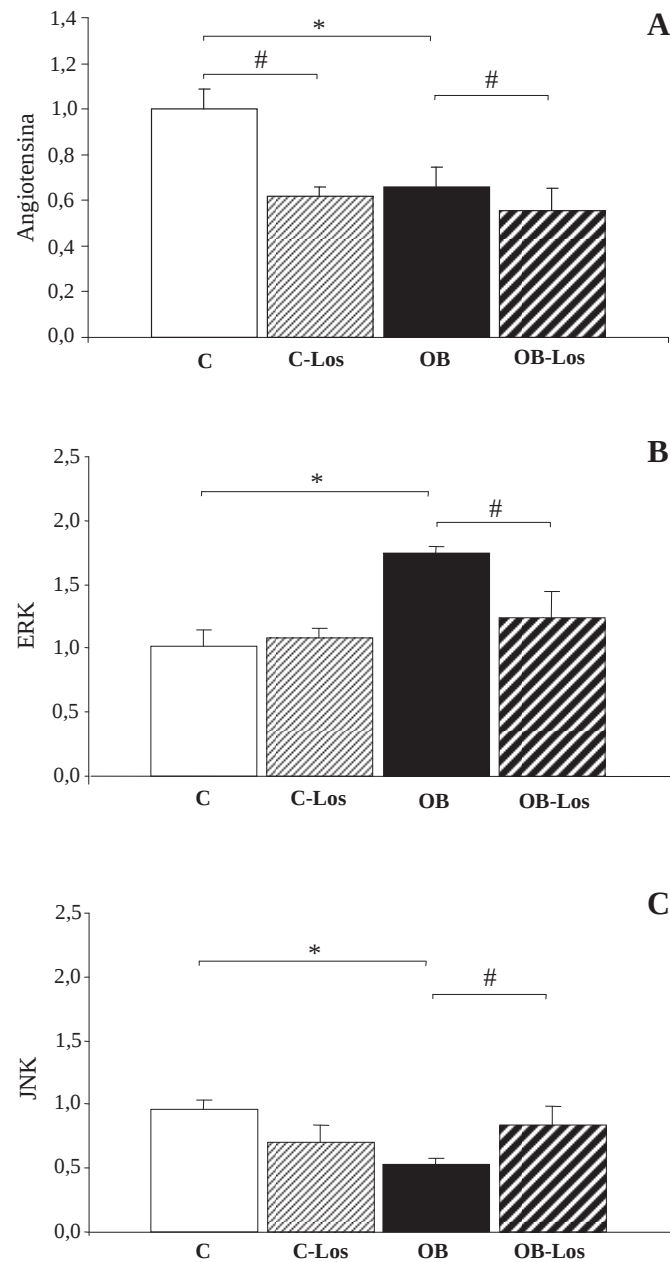


Figura 9. Níveis de expressão protéica de (A) angiotensina, (B) *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) e (C) *c-Jun N-terminal kinases* (JNK), procedentes do miocárdio e obtidos por Western-Blot; resultados normalizados pela expressão do gene constitutivo *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH); C: grupo controle; C+Los: grupo controle, tratado com losartan; OB: grupo obeso; OB+Los: grupo obeso, tratado com losartan; valores em média $\pm$ erro-padrão; * $p < 0,05$ para comparações entre condições biométricas distintas; # $p < 0,05$ para comparações relacionadas a vigência de medicação; ANOVA e teste de Tukey.

Sobre os peptídeos ativados pela ação insulínica, na Figura 10 (A e B), são apresentados os resultados referentes à expressão protéica da subunidade β do receptor de insulina (β RI), em níveis totalizados e sob fosforilação em tirosina nas posições 1162 e 1163 ($\text{Tyr}^{1162, 1163}$ - β RI). Embora a expressão total não tenha sido diferente entre as condições biométricas, o grupo OB exibiu maior índice de fosforilação de tirosina do β RI em relação ao C. A administração de losartan ampliou a expressão de β RI fosforilado em ambos os grupos medicados (C: $1,00 \pm 0,15$ vs. OB: $1,61 \pm 0,29$ UA, $p < 0,05$; C+Los: $1,87 \pm 0,23$ vs. OB+Los: $2,32 \pm 0,20$; $p > 0,05$; Figura 10A e 10B).

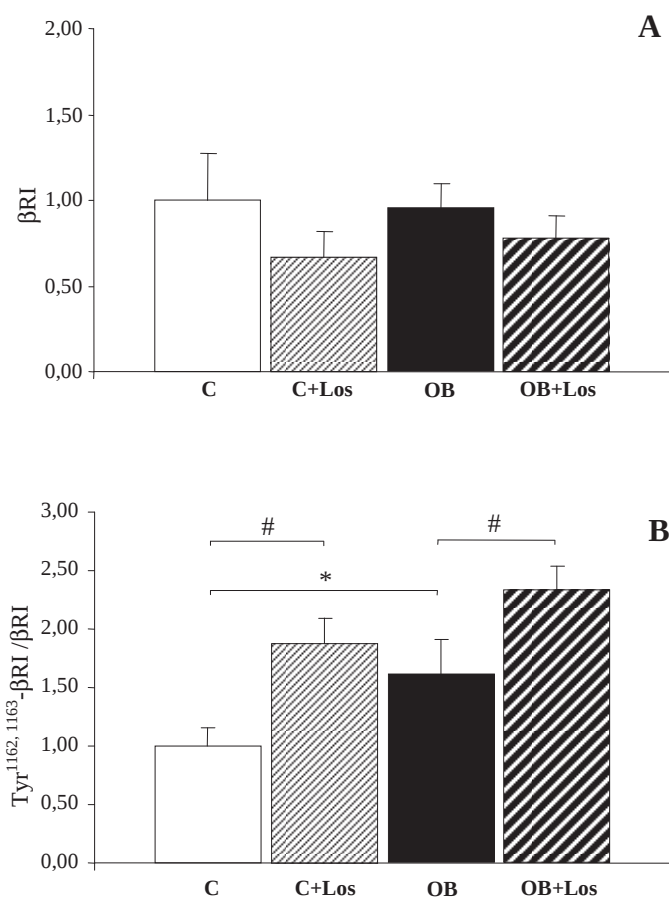


Figura 10. Níveis de expressão protéica de (A) subunidade β do receptor de insulina (β RI) procedente do miocárdio e (B) β RI com fosforilação sob resíduos de tirosina ($\text{Tyr}^{1162, 1163}$ - β RI); resultados de β RI normalizados pela expressão do gene constitutivo *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH); C: grupo controle; C+Los: grupo controle, tratado com losartan; OB: grupo obeso; OB+Los: grupo obeso, tratado com losartan; valores em média $\pm$ erro-padrão; * $p < 0,05$ para comparações entre condições biométricas distintas; # $p < 0,05$ para comparações relacionadas a vigência de medicação; ANOVA e teste de Tukey.

Na sequência, são expostos os resultados da expressão da subunidade catalítica p85 do PI3K, totalizada e no estado fosforilado em tirosina da posição 508 (Tyr⁵⁰⁸-PI3K). A obesidade, isoladamente, mostrou-se associada com maior expressão de PI3K nos dois níveis de comparação (C: $1,00 \pm 0,15$ vs. OB: $1,23 \pm 0,06$ UA, $p < 0,05$; C+Los: $1,01 \pm 0,14$ vs. OB+Los: $1,68 \pm 0,25$ UA, $p < 0,05$; Figura 11B). Contudo, a expressão deste peptídeo sob fosforilação em tirosina foi similar entre os grupos C e OB ($p > 0,05$). Na vigência de losartan, ambos os indicadores de expressão, total (OB: $1,23 \pm 0,06$ vs. OB+Los: $1,68 \pm 0,25$ UA, $p < 0,05$) e fosforilado (OB: $0,90 \pm 0,07$ vs. OB+Los: $2,11 \pm 0,39$ UA, $p < 0,05$; Figura 11C), revelaram-se ampliados no grupo OB+Los. Entre os grupos C, observou-se que a atividade tirosina-quinase do PI3K foi também elevada com a intervenção farmacológica (C: $1,00 \pm 0,39$ vs. C+Los: $1,71 \pm 0,26$ UA, $p < 0,05$), embora os níveis totais não tenham diferentes entre os grupos.

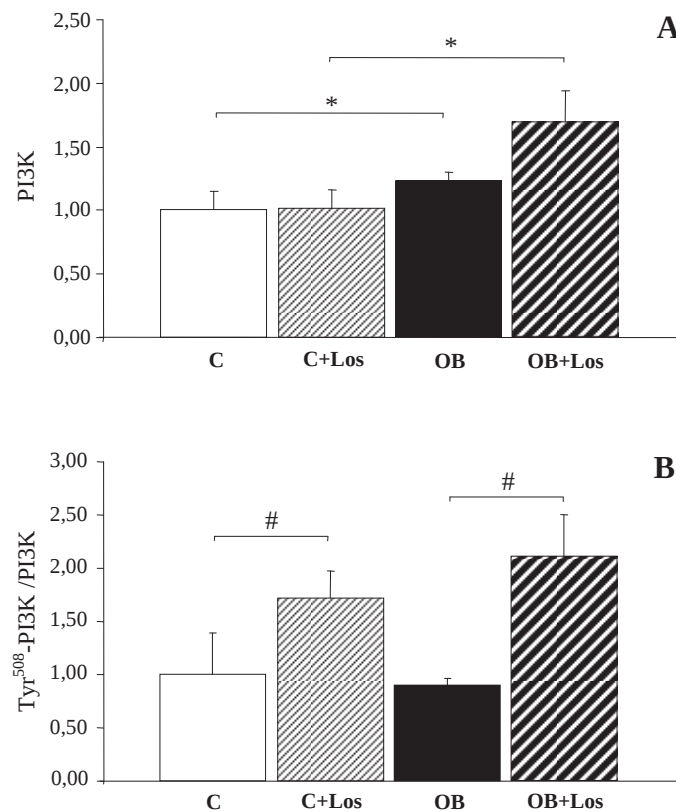


Figura 11. Níveis de expressão protéica de (A) subunidade catalítica p85 do *phosphatidil inositol 3 quinase* (PI3K) procedente do miocárdio e (B) PI3K sob fosforilação de resíduos de tirosina da posição 508 (Tyr⁵⁰⁸-PI3K); resultados de PI3K normalizados pela expressão do gene constitutivo *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH); C: grupo controle; C+Los: grupo controle, tratado com losartan; OB: grupo obeso; OB+Los: grupo obeso, tratado com losartan; valores em média $\pm$ erro-padrão; * $p < 0,05$ para comparações entre condições biométricas distintas; # $p < 0,05$ para comparações relacionadas a vigência de medicação; ANOVA e teste de Tukey.

4. DISCUSSÃO

Sob a premissa inicial de que a obesidade se associa com inúmeros distúrbios modulados pelo acionamento do receptor AT_1 , a proposta do presente trabalho foi analisar se a intervenção com losartan, um antagonista do AT_1 , atenua a manifestação dessas desordens decorrentes da condição biométrica. Pautando-se nos resultados alcançados, confirma-se a ocorrência de múltiplas anormalidades metabólicas, endócrinas e remodelação cardíaca no presente modelo experimental. Essas respostas mostraram-se associadas com ativação de MAPK-ERK e mecanismos de resistência à insulina no miocárdio. Cabe destacar que importante parcela das alterações metabólicas e endócrinas foi amenizada com a administração de losartan. Em sincronismo, relevante volume de respostas fenotípicas cardíacas, moduladas pela via de MAPK-ERK, revelou-se amortizado, materializando que a estimulação do receptor AT_1 é vigente na obesidade exógena. Em contrapartida, alguns efeitos metabólicos, como hipercolesterolemia e hiperleptinemia, e respostas proliferativas do miocárdio, especialmente, densidade de β -MHC, mantiveram-se inalteradas no grupo OB tratado com losartan. Este cenário revela que outros atributos causais, não relacionados a ativação do eixo Ang-II/ AT_1 , são também agentes de distúrbios orgânicos relacionados a maior adiposidade ponderal.

Concernente ao modelo de experimentação, dietas hipercalóricas, ricas em lipídeos e carboidratos, têm sido frequentemente introduzidas para a indução de obesidade em roedores ^(45, 48, 60). Embora centenas de investigações tenham empregado dietas de composição similar, não há consenso relativo ao aporte de macronutrientes utilizado nessas intervenções ⁽⁴⁵⁾. Na presente investigação, a dieta foi obtida a partir de uma combinação de produtos industrializados acrescidos à ração padrão, resultando em relevante conteúdo de ácidos graxos insaturados, combinado com importante sobrecarga de carboidratos, principalmente sacarose ^(50, 53). Este perfil dietético se assemelha a outros modelos experimentais de obesidade, como dieta ocidental, “*western diet*” ⁽⁶⁰⁾, “*junk food*” ⁽⁹⁰⁾ e, especialmente, dieta de cafeteria ^(47, 59, 69, 91, 92). Fato importante a ser destacado, neste contexto, diz respeito a concomitante mescla de

sobrecargas procedentes de lipídeos e carboidratos no presente modelo. Muito embora seja evidente que esses atributos bromatológicos confirmam imprecisões quanto ao papel específico de cada componente na promoção de efeitos metabólicos e cardiovasculares, a caracterização das dietas foi cuidadosamente pautada em evidências epidemiológicas ^(27, 93, 94). É bem estabelecido na literatura que a obesidade humana advém, em parte, de condutas nutricionais sustentadas em relevante variedade e palatabilidade alimentar, as quais mostram-se associadas com altos teores de lipídeos e sacarídeos presentes na dieta ⁽⁹³⁾. Portanto, o modelo experimental adotado no presente estudo foi introduzido, tendo a fisiopatologia da obesidade humana como pilar referencial. Com efeito, diversos trabalhos prévios se utilizaram de similar modelo, ratificando a ocorrência de obesidade e sua associação com inúmeras desordens nutricionais e metabólicas ⁽⁴⁸⁻⁵⁴⁾, como reproduzido na presente investigação.

A condição de obesidade tem se associado com inúmeras comorbidades, como distúrbios nutricionais e variadas desordens metabólicas e endócrinas ^(47, 58-60). Neste aspecto, apesar do menor consumo energético (Tabela 3), os grupos OB manifestaram obesidade, denunciada pelo maior acúmulo de massa desde a 10ª semana de intervenção (dados não-apresentados), e maiores índices de adiposidade (Figura 5A e 5B). Mais importante do que a ingestão calórica, que foi similar entre os grupos C e OB, a composição dietética configura o principal alicerce da elevada deposição adipositária nos grupos obesos, fundamentada na maior eficiência energética (Tabela 4). Segundo a Primeira Lei da Termodinâmica, condições com ampliada ingestão calórica e/ ou reduzida demanda energética propiciam o aumento de estoques adipositários ⁽⁹⁵⁾. Este atributo é resultante da relação entre taxa metabólica de repouso, efeito térmico do alimento e demanda imposta pela atividade física ⁽²⁴⁾. Os lipídeos constituem os macronutrientes de maior densidade energética, com aproximadamente 9 Kcal/g, e menor efeito térmico ⁽⁹⁶⁾. Por conseguinte, o consumo de gordura não se associa com aumento proporcional da oxidação; os lipídeos são então, majoritariamente, convertidos em reservas adiposas, repercutindo no aumento da massa corporal ^(95, 96). Neste aspecto, é provável que a sobrecarga

sacarídea, vigente no presente modelo dietético, tenha acentuado os efeitos biométricos. Crônica ingestão de carboidratos resulta em ampliada síntese de glicogênio e, em decorrência, menor oxidação de lipídeos como recurso energético ⁽⁹⁷⁾. Levando-se em conta que a formação de glicogênio, embora limitada ⁽⁹⁷⁾, seja a principal via de processamento da glicose ingerida, as demandas sacarídeas excedentes, conjugadas a sobrecarga lipídica, seriam destinadas à extra adipogênese. Inúmeras evidências remetem a associação entre dietas hipercalóricas e consequente ampliação ponderal de roedores ^(49-51, 69, 71, 98). Embora a massa corporal seja o principal indicador de obesidade em muitos estudos, diferentes autores mostraram que a elevação ponderal pode não condizer com variações do conteúdo de gordura ⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾. Consonante a esta observação, no presente trabalho, enquanto os grupos OB exibiram, em média, 14,2% de acréscimo de massa, o índice de adiposidade se elevou ao redor de 50% em comparação aos respectivos grupos C.

Em relação a influência da medicação, a administração de losartan não alterou o comportamento nutricional observado na ausência de tratamento (Tabela 3; Figura 5A-B). Na literatura, poucos trabalhos analisaram o impacto de bloqueadores de AT₁ sobre indicadores nutricionais em ratos com obesidade induzida por dieta hipercalórica, com sobrecarga sacarídea e lipídica. Sob período de 16 semanas de dieta, recente trabalho ⁽⁹⁹⁾ revelou que o losartan (20 mg/kg/dia por oito semanas) também não afetou os hábitos alimentares e a composição biométrica de ratos Wistar obesos por dieta de cafeteria. Em protocolo de 10 ⁽¹⁰⁰⁾ e 16 semanas ⁽¹⁰¹⁾ e dose farmacológica menor (10 mg/kg/dia por uma semana), outros autores se depararam com resultados semelhantes, respectivamente, em Wistar e Sprague-Dawley obesos. Em investigação similar, Du Toit et al. ⁽⁴⁷⁾ verificaram que o antagonismo de receptores AT₁ não alterou o comportamento nutricional e biométrico de ratos Wistar, após protocolo de dieta de cafeteria e administração de losartan (30 mg/kg/dia por todo o período) com duração de 16 semanas. Não foram encontrados estudos pautados na influência da medicação sobre a obesidade exógena resultante de protocolos dietéticos crônicos, equivalentes ou superiores a 20 semanas.

Aliado ao perfil biométrico, os resultados são indicativos de que os animais obesos exibiram inúmeros distúrbios metabólicos e endócrinos, como resistência à insulina, menor tolerância glicêmica, dislipidemias e hiperleptinemia (Tabelas 4 e 5; Figura 6A-D), comparado às contrapartes controle. Conjugados aos achados nutricionais e biométricos, esses dados metabólicos se mostram em concordância com evidências de diferentes modelos de obesidade induzida por dieta ^(48-54, 59, 60). Considerando-se o metabolismo glicêmico e insulinêmico, muito embora os níveis basais de glicose mantenham-se inalterados no grupo OB em relação ao C, a associação entre obesidade, menor tolerância à glicose e hiperinsulinemia é bem evidenciada na presente investigação. Estes achados, reforçados pelo índice HOMA, são indicativos de resistência sistêmica a insulina em ratos obesos. Distúrbios de sinalização da insulina se associam com efeitos metabólicos envolvendo o processamento de lipídeos e de glicídios. Esta anormalidade hormonal, por sua vez, configura uma condição patológica, na qual tecidos classicamente ativados pela insulina, como fígado, tecido adiposo e músculos esqueléticos, tornam-se menos responsivos ao estímulo insulínico ^(19, 28). Como resposta a essas alterações, as células β pancreáticas ampliam a secreção de insulina, na busca de se manter a euglicemia ⁽²⁸⁾; em estados crônicos, este efeito culmina na instituição de hiperinsulinemia ^(19, 28). Neste aspecto, considerando-se os dados do presente estudo, é possível que a hiperinsulinemia tenha, no período de jejum, acentuado a captação tecidual de glicose, o que fundamentaria os índices glicêmicos inalterados no grupo OB, sob o ponto de vista estatístico. Os achados de glicemia na ausência de losartan conferem parcialmente com evidências da literatura, mostrando que a obesidade induzida por dieta manteve-se atrelada com distúrbios insulinêmicos e alterações da tolerância à glicose, acompanhadas de aumento ^(55, 101) ou ausência de modificações dos níveis glicêmicos basais ^(48, 49, 52, 54). Du Toit et al. ⁽⁴⁷⁾, em modelo de obesidade provinda da dieta de cafeteria, constataram hiperglicemia basal não acompanhadas de alterações insulinêmicas, após 16 semanas experimentais.

Sobre a influência medicamentosa, a administração de losartan no grupo OB+Los

culminou em normalização da tolerância glicêmica e redução dos índices basais de glicemia e HOMA em relação aos grupos OB; quanto à insulina, embora o losartan reduzisse a insulinemia basal em ambos os grupos tratados, as diferenças atreladas à obesidade se mantiveram entre C+Los e OB+Los (Figura 6A). Como discorrido na seção introdutória, a Ang-II configura um modulador heterólogo da sinalização insulínica, fomentando inúmeros mecanismos citosólicos de resistência à insulina, secundários à ativação do receptor AT_1 ⁽⁶⁻⁹⁾. Sob bloqueio farmacológico, as vias de interação citosólica entre Ang-II e insulina, dependentes do acionamento do receptor AT_1 , são amortizadas. No cotejo com fontes da literatura, em doses menores (10 mg/kg/dia por 12 semanas), a administração de losartan reduziu a glicemia, mas não afetou os índices de insulinemia e HOMA na obesidade induzida por dieta saturada, após 20 semanas ⁽¹⁰²⁾. Sob dose similar no decorrer de uma semana, Huisamen et al. ⁽¹⁰¹⁾ não denotaram alterações significativas propiciadas pela administração de losartan na obesidade induzida por dieta de cafeteria ao longo de 15 semanas. Considerando-se doses maiores (20 mg/kg/dia, por uma semana), Kong et al. ⁽⁹⁹⁾ também não detectaram mudanças importantes de insulinemia e HOMA em ratos obesos, após 16 semanas de dieta de cafeteria. Estas dissonâncias decorrem, muito provavelmente, de dosagens medicamentosas inferiores à utilizada neste trabalho. Com razão, a administração de losartan na quantidade de 30 mg/kg/dia culminou em menores índices glicêmicos na obesidade induzida por dieta de cafeteria ⁽⁴⁷⁾.

Complementar ao quadro metabólico, a ocorrência de altos níveis circulantes de triglicérides e ácidos graxos não-esterificados (Tabela 5) junto ao grupo OB pode derivar do consumo crônico de lipídeos e açúcar aliado ao quadro de resistência à insulina. Essa condição acarretaria aumento da formação e captação de triglicérides na forma de quilomícrons, elevação da produção hepática de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e/ou menor captação de triglicérides em sítios periféricos ⁽⁹⁷⁾. Outro fator preponderante no desígnio de dislipidemias comuns à obesidade consiste da exacerbada atividade lipolítica adipositária ^(103, 104); o tecido adiposo é postulado como um agente chave na regulação do metabolismo lipídico e glicídico

⁽¹⁰⁵⁾. Antes considerado um órgão inerte e restrito à reserva energética, o tecido adiposo configura, na verdade, uma fonte de peptídeos com relevante papel endócrino, interagindo com o sistema nervoso central e tecidos periféricos ⁽¹⁰⁴⁾. Substâncias como leptina, interleucinas e fator de necrose tumoral (TNF- α), liberadas pelo tecido adiposo, promovem efeitos inflamatórios, anti-lipogênicos e lipolíticos, mediados por diminuição da atividade da *lipoproteína lipase* e/ou ativação da *lipase hormônio sensível*, principal carreador da lipólise ⁽¹⁰⁴⁾. Além disso, via estimulação do sistema nervoso central, essas adipocitocinas podem induzir a liberação de catecolaminas, acentuando a lipólise ⁽¹⁰³⁻¹⁰⁵⁾. Em conjunto, estes processos acarretariam aumento de frações circulantes de triglicérides e ácidos graxos, fundamentando os achados do presente estudo.

A normalização das frações de TG e NEFA, provindos do antagonismo do receptor AT₁, é sugestiva da participação da Ang-II na promoção de dislipidemia. Considerando-se que o bloqueio do AT₁ melhorou a sensibilidade à insulina e, por conseguinte, a lipogênese, é muito provável que este mecanismo tenha contribuído na normalização dos índices lipídêmicos dos animais OB+Los. Similares efeitos decorrentes da ação de antagonistas do receptor AT₁ foram confirmados em modelos genéticos de obesidade ⁽⁴¹⁻⁴³⁾. Em modelos de dieta, entretanto, Du Toit et al. ⁽⁴⁷⁾ mostraram que o tratamento com losartan, concomitante à indução de obesidade com dieta de cafeteria por 16 semanas, não modificou o quadro dislipidêmico de ratos obesos. Logo, o presente modelo de obesidade exógena reproduz mecanismos metabólicos integrados, já constatados na obesidade endógena.

Em associação aos indicadores de lipídemia, os animais obesos exibiram hipercolesterolemia comparado aos controles, ainda que os índices de LDL e HDL tenham se mantido inalterados (Tabela 5); esses achados conferem adicionais subsídios para o desígnio de dislipidemia ligada à obesidade. Clinicamente, o quadro de dislipidemia consiste de concomitantes ampliações de frações séricas de triglicérides, ácidos graxos e lipoproteínas de baixa densidade (LDL), associadas com redução de lipoproteínas de alta densidade (HDL) ⁽¹⁰⁵⁾.

No entanto, a caracterização de dislipidemias em espécimes de roedores comuns, como rato e camundongo, configura tarefa penosa e complexa ^(106, 107). Linhagens comuns de roedores, como o rato Wistar, são geralmente resistentes ao desenvolvimento de dislipidemia e aterosclerose. Em contraste ao metabolismo lipídico humano, amplamente dependente do LDL, o processamento e transporte lipídico desses animais são, primariamente, atrelados à formação de HDL ⁽¹⁰⁷⁾. Em razão disto, como constatado por Sinitskaya et al. ⁽¹⁰⁶⁾, a ocorrência de dislipidemias nos moldes humanos é difícil, mesmo frente a intervenções nutricionais com alto aporte de carboidratos e lipídeos. Sob estas considerações, provavelmente, os altos índices de colesterol total podem estar relacionados às frações de triglicérides, designando maior quantidade de VLDL. Por outro lado, diferindo dos demais efeitos metabólicos, que são ligados à adiposidade, os índices séricos de colesterol são, majoritariamente, determinados pelo aporte de colesterol da dieta. É importante recordar que a composição lipídica das rações utilizadas neste estudo é provida de ácidos graxos insaturados, advindos de fontes vegetais como óleo de milho e amendoim ^(50, 53). Ácidos graxos insaturados são potenciais redutores do teor sérico de colesterol, por exacerbar a captação hepática de colesterol ⁽¹⁰⁸⁾, enquanto que lipídeos saturados estão associados com aumento de CT e LDL com concomitante redução de HDL ⁽⁵⁷⁾. Essas propriedades são acentuadas, principalmente, quando a composição dietética de ácidos graxos é acrescida de colesterol, como vigente nas dietas DH-I, DH-II, DH-IV e DH-V do presente trabalho ^(50, 53). Cabe realçar que o óleo de milho, presente nas dietas utilizadas neste trabalho é rico em fitoesteróis, como β -sitosterol e campesterol ⁽¹⁰⁹⁾. Esses compostos competem com o colesterol na captação entérica e inclusive nas propriedades estruturais, como composição de membranas celulares ⁽¹¹⁰⁾, conferindo subsídios adicionais para a maior concentração sérica de colesterol.

Ademais, os achados de colesterol total foram minimamente influenciados pelo losartan, contrastando com demais efeitos metabólicos. Levando-se em conta que a estimulação do receptor AT₁ mostrou-se associar com formação hepática e aumento do conteúdo circulante

de colesterol ⁽¹¹¹⁾, provavelmente, estas discrepâncias se sustentaram na obesidade, mediante a ação do losartan. Similar perfil de resposta foi denotado em ratos obesos *Zucker*, com manutenção dos índices de colesterol frente à redução de ácidos graxos em face do antagonismo de receptores AT₁ ⁽¹¹²⁾. A relação entre bloqueio do receptor AT₁ e diminuição dos índices de colesterol parece ser mais consistente em condições de exacerbada concentração sistêmica de Ang-II, como na hipertensão essencial ^(37, 38, 113). Inúmeros ensaios clínicos, inclusive, têm fracassado em demonstrar a reversão da hipercolesterolemia em sujeitos obesos não hipertensivos sob antagonismo do AT₁ ⁽¹¹⁴⁻¹¹⁶⁾; o inverso foi evidenciado em indivíduos com hipertensão ⁽¹¹⁷⁾. Contudo, Ran et al. ⁽¹¹⁸⁾ mostraram que a infusão contínua de Ang-II pouco afetou os índices de colesterol em roedores Wistar, ainda que a pressão arterial e os níveis de triglicérides tenham se ampliado. Por sua vez, a manutenção da hipercolesterolemia no grupo OB+Los poderia decorrer, também, da intervenção dietética, hiperlipídica e hipercolesterolêmica, utilizada no presente trabalho ^(50, 53). Considerando-se a influência isolada da obesidade, a ocorrência de distúrbios colesterolêmicos é pouco clara na literatura. Em estudo recente, embora Leopoldo et al. ⁽⁵⁷⁾ tenham observado hipercolesterolemia em ratos obesos por dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica de período breve, 15 semanas, outros estudos prévios retrataram resultados divergentes com 15 ⁽⁷¹⁾, 20 ⁽⁵⁵⁾ e 45 semanas ⁽⁵⁶⁾. Diferenças alusivas às linhagens e ao protocolo de obesidade, considerando-se as dietas e a extensão de tratamento, podem fundamentar estas divergências. Em relação à obesidade exógena e sua associação com o antagonismo de AT₁ por meio de losartan, escassas e inconsistentes evidências fornecem subsídios para este debate. Enquanto Du Toit et al. ⁽⁴⁷⁾ denotaram reversão da hipercolesterolemia com relevante dose de losartan (30 mg/kg/dia), Kong et al. ⁽⁹⁹⁾ não verificaram efeitos significativos sob menor dose medicamentosa (20 mg/kg/dia). Além da dose, é importante destacar que a extensão do tratamento farmacológico mostrou-se menor no estudo de Kong et al. ⁽⁹⁹⁾: oito versus 16 semanas.

Conjugado aos achados nutricionais e metabólicos, a obesidade foi também

caracterizada por ocorrência de hiperleptinemia (Figura 6B). Em conformidade com o presente trabalho, ensaios clínicos ⁽¹¹⁹⁾ e experimentais ^(47, 60) têm demonstrado a associação entre obesidade e hiperleptinemia. Uma investigação pioneira de Zhang et al. ⁽¹²⁰⁾, envolvendo a identificação da leptina no final do século passado, conferiu sustentação inicial para ponderações sobre essas novas atribuições funcionais dos adipócitos. A leptina é sintetizada pelo tecido adiposo e a dimensão de sua influência mostra-se atrelada ao grau de adiposidade corporal ⁽¹⁰⁴⁾. Seu principal efeito envolve o controle da saciedade e é mediado por mecanismos diretos de ativação ou inibição de neurônios dos núcleos hipotalâmicos arqueado, ventromedial e dorso-medial; estes recintos celulares apresentam receptores hormonais *Ob-Rb*, acionados pela leptina ^(121, 122). Mecanismos sinalizadores principiados no *Ob-Rb* canalizam a transdução de sinal pela via bioquímica das proteínas *janus-quinase* (JAK) ⁽¹²³⁾. Por meio destas cascatas de sinalização, demonstrou-se também que a leptina possui propriedades pró-inflamatórias e promove agregação plaquetária ^(123, 124). Em geral, o consumo de dietas hipercalóricas acarreta resistência à ação da leptina, com resultante hiperfagia e, por conseguinte, acentuada evolução ponderal e adipositária ⁽¹²⁴⁾. Cabe ressaltar, contudo, que o quadro de resistência caracteriza-se por efeitos seletivamente diversos nos tecidos corporais ⁽¹²³⁾. Enquanto algumas respostas, como o apetite, são amortizadas com reticência, outros efeitos, como a lipólise, podem se mostrar potencializados ^(104, 123, 124). Neste contexto, a menor ingestão calórica (Tabela 3) dos animais OB em comparação às contrapartes C pode indicar que a hiperleptinemia, secundária a ampliada adiposidade, foi efetiva na normalização do balanço energético.

A manutenção da hiperleptinemia na vigência de losartan mostrou que a produção de leptina pelo tecido adiposo não está associada ao acoplamento da Ang-II junto ao receptor AT₁. Poucos estudos relacionaram o bloqueio de receptores AT₁ com os níveis sistêmicos de leptina. Cassis et al. ⁽¹²⁵⁾ mostraram que a Ang-II se associou com secreção de leptina em adipócitos isolados, fato que revelou-se atenuado sob a influência de um inibidor da enzima conversora de angiotensina. Umeda et al. ⁽⁷⁵⁾ verificaram que o antagonismo de AT₁ induziu

redução dos níveis séricos de leptina em ratos espontaneamente hipertensos obesos, sob dieta enriquecida de sacarose. Cabe frisar que estes achados foram acompanhados de diminuição da adiposidade e da expressão do gene *ob*, relacionado à síntese de leptina. Considerando-se modelos de obesidade exógena, Velkoska et al. ⁽⁹²⁾ obtiveram achados similares aos obtidos neste trabalho, após 12 semanas de intervenção com inibidor de ECA junto a ratos com obesidade induzida por dieta hipercalórica. Clinicamente, a redução dos níveis de leptina de indivíduos obesos só se mostrou possível com associação de programas de emagrecimento à intervenção farmacológica de inibição da ECA ⁽¹²⁶⁾. Portanto, os índices hormonais de leptina aparentam ser fortemente direcionados pela dimensão da adiposidade, em conformidade com os resultados do presente estudo.

Segundo diversas evidências da literatura, dentre inúmeros efeitos metabólicos ligados a condição biométrica, a ativação do sistema renina-angiotensina (SRA) configura uma importante comorbidade que acompanha a obesidade ⁽²⁷⁾. Classicamente, o SRA consiste de uma cascata de eventos enzimáticos essenciais na manutenção da homeostase sistêmica e cardiovascular ⁽¹⁰⁾. Envolve, em princípio, a clivagem do angiotensinogênio, resultante da ação da protease renina, propiciando a produção de angiotensina I, a qual é, em seguida, convertida a Ang-II numa reação carregada pela enzima conversora da angiotensina (ECA) ^(10, 17, 27, 127). Pelo menos três hastes de ativação do SRA estão ligadas à adiposidade: 1) aumento da secreção de angiotensinogênio pelo tecido adiposo, a segunda maior fonte do precursor de angiotensina I; 2) exacerbada produção e ação de adipocitocinas, culminando em ampliada síntese hepática de aldosterona e 3) elevação da concentração sistêmica de renina e ECA ⁽²⁴⁾. Considerando-se o presente estudo, a análise da atividade sistêmica da ECA, embora maior na obesidade, mostrou-se similar entre os grupos C e OB ($p>0,05$). Não foram encontrados trabalhos que analisaram o comportamento dessa variável em modelos de obesidade induzida por dieta. A ECA se apresenta junto à superfície de células endoteliais em todo o organismo e é particularmente abundante no pulmão, intestino, tecido adiposo, placenta e membranas renais ⁽¹²⁷⁾; a ECA sérica, foco do

presente trabalho, é procedente dessas diferentes fontes teciduais. A ação da ECA é influenciada por atividade da renina e disponibilidade de angiotensinogênio para a formação de Ang-I⁽¹²⁸⁾. Levando-se em conta que o tecido adiposo configura a segunda maior fonte de angiotensinogênio, provavelmente, a relativa amortização da atividade da ECA na obesidade não decorreria da falta do substrato para a formação de Ang-I. Um mecanismo mais provável seria a redução, por *feedback*, da síntese e atividade de renina, consequente à maior formação de Ang-II pelo tecido adiposo. Várias evidências têm comprovado que a hipertrofia dos adipócitos resulta em exacerbada síntese e secreção de Ang-II^(34, 103, 104, 129). Ampliadas concentrações de Ang-II culminam em redução da formação renal e atividade sistêmica da renina, resultando em menor clivagem de angiotensinogênio em Ang-I^(77, 129). A diminuída disponibilidade de Ang-I implicaria em normalizada atividade da ECA. Embora meramente especulativos, esses mecanismos podem fundamentar a ausência de diferenças significativas entre C e OB. Para melhor elucidação da relação entre obesidade e SRA no presente modelo, análises diretas da atividade da renina, níveis de angiotensinogênio e Ang-II e/ou atividade da ECA em diferentes locais mostram-se fundamentais e deverão ser utilizadas em futuros estudos.

Em relação à influência do losartan sobre a atividade da ECA, a combinação de condição biométrica com medicação externou interação significativa. Frente à administração de losartan, na obesidade, observou-se um decréscimo, ainda que não revestido de significância estatística ($p > 0,05$), no cotejo entre grupos OB; em contraste, entre os grupos C, constatou-se um aumento significativo da atividade enzimática. A ampliação da atividade no grupo C+Los configura um mecanismo de *feedback* derivado do bloqueio de acesso tecidual da Ang-II. Nesta perspectiva, a maior atividade de ECA seria voltada à maior produção de Ang-II na busca de se compensar o tamponamento de receptores AT₁^(34, 77). Considerando o grupo obeso submetido a losartan, pode-se discutir sobre a disponibilidade de substrato sérico para a formação de Ang-II. Como referido anteriormente, o SRA é regulado pela dimensão de adiposidade^(34, 129). Além disso, três principais sítios afetados por controle retroativo do SRA incluem a produção de

angiotensinogênio no fígado e tecido adiposo, assim como síntese e secreção de renina no rim^(130, 131). A Ang-II regula positivamente a produção hepática e adipocitária de angiotensinogênio e modula negativamente a transcrição e formação de renina no rim^(34, 129). Admite-se que estes eventos sejam amortizados mediante antagonismo do receptor AT₁; em razão da menor disponibilidade de angiotensinogênio, apesar da maior produção de renina, a formação de Ang-I seria reduzida, acarretando uma diminuição da atividade da ECA. Estes subsídios fundamentariam a relativa diminuição da ação enzimática, detectada no grupo OB+Los.

Destarte, os resultados obtidos consolidam a hipótese de que obesidade induz desordens nutricionais, metabólicas e hormonais, algumas das quais, reguladas pelo acionamento do receptor AT₁. Entretanto, outras variáveis analisadas, como colesterol e leptina, não se mostram influenciadas pelo antagonismo de AT₁, evidenciando que outros atributos causais podem responder por estas alterações decorrentes da obesidade.

Em relação ao comportamento cardiovascular, os resultados da presente investigação revelaram que a pressão arterial sistólica manteve-se inalterada nos animais obesos (Tabela 6). Em geral, interações envolvendo agentes adrenérgicos, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, SRA e sistema nervoso simpático podem desencadear mecanismos de vasoconstrição periférica, que são o cerne da hipertensão arterial secundária à obesidade⁽²⁷⁾. Em ensaios experimentais, vários autores têm mostrado que a obesidade induzida por dieta hipercalórica acarreta disfunção da reatividade vascular^(81-84, 132), um mecanismo que pode se associar com ocorrência de hipertensão arterial. A ausência de diferenças pressóricas detectáveis entre os grupos C e OB, entretanto, não descarta a ocorrência de distúrbios pressóricos vinculados à obesidade. Em ratos obesos e hipertensos, Sedová et al.⁽¹³³⁾ constataram que os índices pressóricos mostravam-se elevados somente durante o período noturno, quando os animais estavam mais agitados, ainda que os níveis hemodinâmicos médios não fossem diferentes. Por sua vez, inúmeras fontes da literatura exibiram resultados dissonantes quanto aos efeitos pressóricos; matrizes distintas de animais, aliadas à falta de consistência metodológica

quanto às intervenções dietéticas podem parcialmente explicar a diversidade de achados encontrados. Alguns autores detectaram aumento dos índices pressóricos em Wistar^(47, 52, 59) e Sprague-Dawley^(92, 132, 134) após períodos breves, de 10 a 16 semanas de dietas hipercalóricas com sobrecarga lipídica e sacarídea, um perfil dietético similar às nossas intervenções. Sob semelhantes condições, entretanto, outros estudos revelaram ausência de alterações da pressão arterial em ratos obesos das linhagens Sprague-Dawley⁽¹³⁵⁾ e Wistar⁽⁵⁴⁾, após protocolos de 12 e 15 semanas de dieta. Comportamento parecido foi constatado em ratas obesas da linhagem Fischer⁽¹³⁶⁾ e ratos Wistar-Kyoto obesos^(49, 50), após protocolos com 20 semanas de duração. Levando-se em conta delineamentos de maior extensão, poucos e conflitantes estudos abordaram a ocorrência de distúrbios pressóricos em modelos de obesidade induzida por dieta rica em gorduras e açúcares. Alguns pesquisadores constataram aumento da pressão arterial em Wistar⁽¹³⁷⁾ e ratas Fischer⁽¹³⁸⁾ com obesidade induzida por sobrecarga lipídica e sacarídea após 26 semanas e dois anos de experimentação, respectivamente. Entretanto, Paulino et al.⁽⁵³⁾ não verificaram modificações pressóricas em roedores obesos da linhagem Wistar, após 35 semanas de dieta similar à utilizada neste trabalho. Em adição, dois estudos recentes^(56, 139), conduzidos em nosso laboratório, mostraram que a obesidade induzida por dieta hipercalórica não afetou a pressão arterial após 30 e 45 semanas de protocolo experimental; em ambos os trabalhos, o aporte dietético não continha sobrecarga sacarídea. Neste sentido, algumas evidências revelaram que dietas hiperlipídicas são primariamente associadas com maior produção endotelial de óxido nítrico, um clássico agente vasodilatador⁽¹⁴⁰⁾. Estes efeitos são acionados, principalmente, por insulina⁽¹⁴¹⁾ e leptina⁽¹⁴²⁾, as quais podem interagir e exacerbar a produção de óxido nítrico, com consequente relaxamento endotelial. Estados de hiperinsulinemia e hiperleptinemia, como verificado no grupo OB, podem acentuar a formação de óxido nítrico, com secundária redução da resistência periférica e da pressão arterial. Similar mecanismo mostrou-se presente em condições clínicas relacionadas ao paradoxo da obesidade, ou ainda “obesidade descomplicada”, isto é, desprovida de importantes intercorrências cardiovasculares⁽¹⁴³⁾.

Conjugado ao perfil cardiovascular, alguns indicadores estruturais *in vivo*, obtidos por ecocardiograma, como espessuras diastólicas do septo interventricular, da parede posterior e espessura relativa do ventrículo esquerdo, denunciaram ocorrência de hipertrofia cardíaca no grupo OB (Tabela 7). Analogamente, indicadores morfométricos microscópicos (Figura 7) confirmaram a ocorrência de hipertrofia miocárdica, ainda que evidências anatômicas macroscópicas, relacionadas à massa do ventrículo esquerdo em valores absolutos ($p=0,07$) e relativos, não tenham corroborado a instalação de proliferação miofibrilar derivada da obesidade (Tabela 9). Provavelmente, essa dissensão de resultados é decorrente de especificidades inerentes às condições metodológicas. Nas análises *in vivo*, são avaliados indicadores geométricos regionais ao cabo da diástole; análises macroscópicas *post-mortem* consistem de mensurações globais da massa ventricular, desconsiderando diferenças contráteis e morfológicas regionais do VE. Em referência à literatura, a avaliação macroscópica *post-mortem* apresenta-se como um dos principais métodos de estudo da morfologia cardíaca em modelos experimentais de obesidade exógena^(48, 60). Entretanto, a divergência de resultados sobre hipertrofia miocárdica revela-se substancial nos diversos períodos protocolares. Em intervalos de 10 a 16 semanas, embora numerosos estudos^(54, 92, 135, 144) não notificassem alterações morfológicas, outros autores constatarem aumento de massa cardíaca em ratos obesos^(47, 52, 57). Ainda que as inconsistências sejam mais brandas em intervalos de 20 semanas^(49, 55), sobressaem-se novamente em períodos superiores. Assim como na pressão arterial, diferentes linhagens de animais e intervenções dietéticas distintas, aliadas a oscilações instrumentais poderiam explicar, pelo menos parcialmente, essa diversidade de achados. Enquanto Pinheiro et al.⁽⁵⁹⁾ verificaram hipertrofia cardíaca com 24 semanas, Bruder-Nascimento et al.⁽¹³⁹⁾, Paulino et al.⁽⁵³⁾ e Nascimento et al.⁽⁵⁶⁾ não confirmaram estes achados com 30, 35 e 45 semanas, respectivamente.

Aliado às análises macroscópicas, outro método comumente utilizado para avaliação morfológica do miocárdio consiste na mensuração da área seccional transversa celular em secções teciduais coradas com hematoxilina-eosina; porém, relativamente, poucos estudos se

utilizaram de mensurações morfométricas em modelos de obesidade induzida por dieta hipercalórica ^(49-53, 59). Ainda mais intrigante é a variedade de indicadores de análise. Somente Paulino et al. ⁽⁵³⁾ se pautaram na análise do diâmetro celular passando pelo núcleo e não constataram alteração da dimensão miocitária. Embora concordantes em relação à ausência de modificações celulares, outros estudos ^(49, 50) tiveram a área seccional transversa como princípio de estudo morfométrico. Sob esta perspectiva, no estudo de Leopoldo et al. ⁽⁵²⁾, os autores não constataram hipertrofia tecidual, contrastando com resultados macroscópicos, decorridas 15 semanas experimentais. Embora único a identificar hipertrofia cardíaca em período crônico, o estudo de Pinheiro et al. ⁽⁵⁹⁾ merece destaque, em razão do rigor metodológico. Os autores fizeram uso não somente de estereologia macroscópica, como também de inúmeros índices estereológicos microscópicos, como volume e densidade numérica de cardiomiócitos e núcleos, além da área seccional transversa.

Assim como as condutas macroscópicas, a análise morfométrica exhibe limitações de precisão que podem conduzir a incorreções de interpretação. Gerdes ⁽¹⁴⁵⁾ pontua quatro fatores que podem restringir a precisão do procedimento e conduzir a incorreções de interpretação: 1) variabilidade do ângulo de corte tecidual, havendo superestimação da área miocitária; 2) condição contrátil das amostras teciduais, com fibras contraídas adjacentes a fibras relaxadas; 3) mensurações realizadas somente considerando o núcleo, com iminente risco de superestimação das aferições e 4) a área seccional, isoladamente, não providencia entendimento adequado do grau de hipertrofia celular. Sob estas considerações, para a tomada de medidas morfométricas do miocárdio, optou-se pela análise morfométrica nuclear agregada a área seccional transversa do cardiomiócito. Em análises bidimensionais, esse indicador mostrou ser um método analítico mais acurado do que a área seccional transversa para avaliar as dimensões dos cardiomiócitos ⁽⁸⁰⁾. Levando-se em consideração que ambos os índices mostraram-se ampliados com a condição biométrica, pode-se concluir que a obesidade se associa com hipertrofia miocárdica, ratificando achados *in vivo*. Em estudo precedente, constatou-se ocorrência de hipertrofia celular,

evidenciada por aumento de volume nuclear, como manifestação primária de remodelação cardíaca, após 20 semanas de experimentação ⁽⁵⁰⁾.

Os indícios de crescimento ventricular (Tabela 11) são consistentes com o conceito de hipertrofia concêntrica do ventrículo esquerdo, caracterizado por deposição paralela de sarcômeros ⁽⁴⁾. Os estímulos para a remodelação proliferativa do miocárdio incluem inúmeros eventos mecânicos e bioquímicos que acionam receptores, canais iônicos e integrinas atadas ao sarcolema ⁽¹⁻⁴⁾. Subsequentes a estes estímulos, variadas vias de sinalização são carreadas no meio citosólico, designando modificações da expressão gênica e síntese protéica ^(3, 4, 13, 14). Dentre os mecanismos de hipertrofia miocárdica, incluem-se agentes proliferativos como endotelinas, catecolaminas, adipocitocinas inflamatórias e Ang-II ⁽¹⁻⁴⁾. Outros autores ^(12, 77) mostraram que a estimulação mecânica do receptor AT₁ aciona mecanismos promotores de remodelação cardíaca, independentes da ação hormonal da Ang-II. Por conseguinte, ainda que a pressão arterial sistólica não tenha se elevado com a condição biométrica, é possível que distúrbios hemodinâmicos não-identificados sobrevenham na obesidade e mantenham relação com estresse parietal e remodelação cardíaca.

Em associação à hipertrofia concêntrica, os ratos obesos apresentaram remodelação da matriz extracelular de colágeno (Figura 7B) e das isoformas de cadeias pesadas de miosina (Figura 8). A ocorrência dessas manifestações configura um atributo comum à remodelação cardíaca típica de condições patológicas ^(1, 3). Considerando-se a ampliada deposição intersticial de colágeno, variados autores documentaram remodelação da matriz extracelular em diferentes protocolos experimentais de obesidade exógena ^(49, 50, 52, 59). O interstício miocárdico é composto por colágeno nas formas fibrilar e não-fibrilar, e diversas proteínas conectivas, como laminina, elastina, proteoglicanos e integrinas ⁽¹⁴⁶⁾. A remodelação da matriz intersticial é resultante de um balanço entre síntese de fibras colágenas, resultante do metabolismo de fibroblastos, e degradação, derivada da ação de metalloproteínases de matriz (MMP) ⁽¹⁴⁶⁾. Perturbações da homeostasia sistêmica e tecidual decorrentes, principalmente, de

condições de sobrecarga hemodinâmica e ação de fatores hormonais proliferativos, culminam em ampliada síntese de colágeno e reduzida degradação por MMPs ⁽¹⁴⁶⁾. Neste sentido, a ocorrência de fibrose intersticial cardíaca poderia ser resultado do cenário inflamatório e multifatorial atrelado a condição de obesidade. Inúmeros investigadores constataram que o acúmulo de colágeno intersticial se associa com ativação de fatores de transformação e crescimento (TGF- β) ⁽¹⁴⁶⁾, secundária a Ang-II ^(47, 134) e/ou inibidor do ativador de plasminogênio do tipo I (PAI-I) ⁽¹⁴⁷⁾. Entretanto, outros agentes como leptina, TNF- α e interleucinas, além de atributos ligados à dieta, como sacarídeos, lípides e estresse oxidativo, configuram potenciais mecanismos de promoção de remodelação intersticial ⁽¹⁴⁸⁾.

Além da remodelação morfológica do coração, a obesidade se associou com maior expressão de isoformas β -MHC (Figura 8), um típico indicador de processos hipertróficos ⁽¹⁻⁴⁾. O tecido cardíaco de animais adultos de pequeno porte, como os roedores, expressa maior quantidade de α -MHC ⁽¹⁴⁹⁾. O alto conteúdo de α -MHC é considerado uma atribuição adaptativa em face do ritmo mais rápido de hidrólise do ATP e correlaciona-se positivamente com os altos valores de frequência cardíaca ⁽¹⁴⁹⁾. Esse padrão de distribuição é modificado por condições fisiopatológicas diversas, como diabetes mellitus ⁽¹⁵⁰⁾, hipotireoidismo ⁽¹⁵¹⁾, restrição alimentar ⁽¹⁵²⁾, hipertensão arterial ⁽⁵¹⁾, e obesidade ^(50, 51). Em estudos prévios, similar modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica mostrou-se associado com aumento de β -MHC em ratos normotensos ⁽⁵⁰⁾ e espontaneamente hipertensos ⁽⁵¹⁾. Embora pouco esclarecidos, mecanismos tipicamente associados a hipertrofia e remodelação intersticial, como processos derivados de adipocitocinas inflamatórias, catecolaminas e Ang-II, além de características da dieta, também poderiam configurar moduladores da síntese de β -MHC ⁽¹⁻⁴⁾.

Em referência ao desempenho funcional, a análise ecocardiográfica revelou que a obesidade se associou com alterações de desempenho sistólico e diastólico, sustentados, respectivamente, em indicadores de maior encurtamento e relaxamento miocárdico (Tabela 8). A função sistólica é determinada por condições de contratilidade, pré e pós-carga, frequência

cardíaca e sincronismo de contração ^(1, 79). Considerando-se que a pressão arterial e frequência cardíaca não se alteraram no grupo OB, a melhoria do desempenho sistólico mantém-se diretamente relacionada com a hipertrofia do ventrículo esquerdo, aliada a possibilidade de maior responsividade miofibrilar frente diferentes estímulos neuro-hormonais, como catecolaminas ⁽¹⁴⁸⁾; condições hiperleptinêmicas, típicas da obesidade, associam-se com ativação de sistema nervoso simpático e liberação de catecolaminas ^(123, 124). O aumento da velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo decorrente de hipertrofia e/ou melhor ativação contrátil miofibrilar mostra-se dissociada da alteração de MHC. Em geral, a conversão proporcional de α - para β -MHC remete à maior economia energética, em razão de menor combustão ATPásica a cada ciclo contrátil ^(149, 153). No curso da remodelação cardíaca, essas alterações estruturais alinham-se a modificações morfológicas, como hipertrofia e fibrose intersticial, e desordens funcionais, relacionadas ao acoplamento entre actina e miosina ⁽²⁻⁴⁾. Neste aspecto, a maior proporção de isoforma β -MHC se traduz, comumente, em menor velocidade de encurtamento miofibrilar ^(153, 154). Contudo, no presente estudo, a remodelação cardíaca derivada da obesidade foi também caracterizada por ampliado desempenho contrátil do coração, indicado, dentre outras variáveis, por maior velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo. Essa dissociação entre a composição de proteínas contráteis e a função pode ser decorrente de inúmeros fatores, dentre os quais, heterogeneidade miocárdica regional e/ou estado de remodelação cardíaca. Considerando-se as variações regionais, as amostras teciduais destinadas à homogeneização protéica e análises de MHC foram removidas da parede anterior do ventrículo esquerdo (Seção 2.8.3.1 em Material e Métodos). Em contraste, as avaliações morfológicas micro e macroscópicas envolveram retalhos teciduais, provindos da parede posterior. Estudos precedentes ^(155, 156) revelaram que a proporção de β -MHC, ainda que reduzida, não é aleatória no coração de roedores adultos. Krenz et al. ⁽¹⁵⁴⁾ constataram que a maior concentração de β -MHC situa-se próximo aos músculos papilares, no endocárdio, numa região anelar ao redor da junção átrio-ventricular. Em outro estudo ⁽¹⁵⁵⁾, os autores verificaram

que as mudanças no fenótipo de MHC são reguladas pela proximidade com o sistema de condução nervosa e variações mecânicas; em geral, quanto mais próximo das fibras de Purkinge e maior a pós-carga contrátil, mais precoce e pronunciada é a conversão de α - para β -MHC. Cabe realçar que a velocidade de encurtamento do sarcômero é também dependente da fosforilação acionadora do complexo de miosinas de cadeia leve, especificamente, a cadeia leve regulatória^(156, 157). É bem evidenciado que este evento é mais pronunciado em cardiomiócitos de procedência epicárdica, comparados às fibras de sítio endocárdico⁽¹⁵⁷⁾. Levando-se em conta a globalidade da avaliação ecocardiográfica em relação à função miocárdica, é possível que a velocidade de encurtamento contrátil da parede posterior seja influenciada pelas particularidades comentadas.

Noutra perspectiva, frente uma agressão contínua, embora os indicadores morfológicos e de MHCs possam configurar condições precursoras de disfunção ventricular e/ou insuficiência cardíaca, essas respostas podem constituir, primariamente, um mecanismo adaptativo, repercutindo, inclusive, em melhor eficiência contrátil do coração⁽⁴⁾. Assim sendo, a magnitude de variações de MHCs no presente trabalho não consubstanciaria a ocorrência de repercussões funcionais significativas. Em ratos adultos, somente proporções de β -MHC equivalentes ou superiores a 70% têm sido associadas com relevante impacto funcional⁽¹⁵⁴⁾. Em analogia, somente ampliações similares ou maiores que 100% no conteúdo intersticial de colágeno têm efeitos sobre o desempenho contrátil⁽¹⁴⁶⁾. Sob estas considerações, os achados morfológicos, moleculares e funcionais confeririam suporte para o delineamento de um processo de remodelação cardiovascular ainda de curso inicial, sem importantes repercussões no desempenho contrátil.

Considerando-se função contrátil, em comparação à literatura, outros estudos, entretanto, documentaram ocorrência de disfunção sistólica em ratos Wistar obesos⁽⁵²⁻⁵⁴⁾. Considerando-se que estas investigações se utilizaram de protocolos muito similares ao do presente trabalho, muito provavelmente, essas diferenças de resposta podem estar ligadas a

linhagem e/ou grau de adiposidade. Levando-se em conta que o Wistar-Kyoto é geneticamente muito próximo do rato espontaneamente hipertenso, estímulos específicos como, por exemplo, condições neuro-hormonais, poderiam induzir respostas fenotípicas similares às do SHR ⁽¹⁵⁸⁾. Em geral, os SHRs apresentam hipertrofia concêntrica e intensa atividade neuro-hormonal, derivada, principalmente, do SRA ⁽¹⁵⁸⁾; em estudo recente, denotou-se ocorrência de hipertrofia em SHR com obesidade induzida por dieta hipercalórica, após 20 semanas experimentais ⁽⁵¹⁾. Comparado a estudos com roedores Wistar ^(48, 52-54), observa-se neste e em estudo anterior ⁽⁴⁹⁾ que os WKY se apresentaram, aparentemente, mais obesos do que seus congêneres, frente similar protocolo experimental. Em analogia, supõe-se que a influência de adipocitocinas possa ser maior em WKY, favorecendo a interação de estímulos que possam ativar o deslizamento miofibrilar no miocárdio. Outro estudo prévio também documentou ocorrência de hipertrofia e melhora de rendimento sistólico em WKY com obesidade induzida por dieta hipercalórica, após 20 semanas experimentais ⁽⁵⁰⁾.

Em relação ao desempenho diastólico, embora a relação E/A não se revele alterada, a onda E está ampliada, enquanto os índices de relaxamento isovolumétrico (TRIV e TRIV/R-R) mostram-se reduzidos nos ratos obesos não-medicados. Esses achados funcionais substanciam desordens de complacência e relaxamento ventricular e poderiam configurar indícios de disfunção diastólica de padrão restritivo ^(1, 158). Nesta perspectiva, resultados de natureza morfológica, como hipertrofia concêntrica e fibrose intersticial, e molecular, como expressão miocárdica de β -MHC, confeririam sustentabilidade adicional ao comprometimento diastólico. Em modelo similar ao do presente estudo, constatou-se ocorrência de achados similares em ratos espontaneamente hipertensos, após 20 semanas de experimentação ⁽⁵¹⁾, reiterando a proximidade genética e ocorrência de respostas similares entre as cepas de WKY e SHR. Disfunção diastólica na obesidade poderia resultar de interação entre demanda hemodinâmica, relacionada à hipervolemia, combinada com efeitos neuroendócrinos de adipocitocinas ⁽¹⁴³⁾.

Entretanto, no presente trabalho, variáveis de morfologia macroscópica, como diâmetro do átrio esquerdo, massa de átrios e umidade tecidual (dados não-apresentados), não corroboraram presença de disfunção diastólica. No contexto metodológico, cabe ressaltar que a avaliação ecocardiográfica do influxo mitral é influenciada por inúmeros fatores, incluindo frequência cardíaca, complacência atrial e ventricular, funcionamento da válvula mitral e pressão do átrio esquerdo ⁽¹⁵⁹⁾. Por conseguinte, muitos autores demonstraram que as variáveis onda E, razão E/A e TRIV são pouco acuradas para se avaliar o desempenho diastólico do ventrículo esquerdo ⁽¹⁶⁰⁻¹⁶²⁾. Considerando-se que somente a fase de enchimento rápido (onda E), em valores absolutos, e o TRIV mostraram-se alterados na obesidade, outros indicativos obtidos por Doppler tissular, como velocidades de pico na proto (onda E') e telediástole (onda A') confeririam maior consistência a delimitação do quadro diastólico ⁽¹⁶²⁾.

Logo, é mais provável que as variações de relaxamento ventricular sejam condizentes com hiper-ativação do desempenho diastólico e se relacionem com ampliada capacidade de captação de cálcio (Ca^{+2}) pela bomba de Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático (SERCA) ⁽¹⁶¹⁾, possivelmente vinculada com maior fosforilação da fosfolambam, secundária a hiperatividade adrenérgica ⁽⁵⁴⁾. Em favor destas suposições, um dos primeiros estudos desenvolvidos em nosso laboratório ⁽⁴⁸⁾ mostrou que a obesidade induzida por dieta hipercalórica se associou com maiores expressões gênicas de SERCA e fosfolambam em roedores Wistar. Portanto, alterações relacionadas ao trânsito citosólico de Ca^{++} na fase de relaxamento, consequentes aos cenários hemodinâmico e neurohormonal poderiam conferir melhor suporte para a ocorrência das modificações de relaxamento ventricular. Conjugado ao maior rendimento sistólico, o melhor desempenho diastólico configuraria um ajuste funcional decorrente de elevado consumo de oxigênio vinculado a ampliada dimensão corporal e menor pós-carga na obesidade ⁽¹⁴³⁾. Clinicamente, estes mecanismos foram observados no paradoxo da obesidade, “obesidade descomplicada” ⁽¹⁴³⁾. Outras investigações de nosso grupo de pesquisa evidenciaram que a obesidade não se associou com alterações funcionais do miocárdio após 15 ^(56, 57), 20 ⁽⁵⁵⁾,

30⁽¹³⁹⁾ e 45 semanas experimentais⁽⁵⁷⁾. Cabe realçar, entretanto, que, nestes protocolos, as dietas hipercalóricas não portavam sobrecarga sacarídea. Portanto, é bem evidente que o processo de remodelação derivado da obesidade exógena é fortemente atrelado a variações de dieta e linhagem de estudo. Novos trabalhos serão potencialmente úteis nesses debates.

Deste modo, considerando-se o perfil cardiovascular, ainda que o presente estudo não revele ocorrência de hipertensão arterial na obesidade, esta condição biométrica se associa com remodelação cardíaca, sustentada por hipertrofia miocitária e ventricular, fibrose intersticial, síntese de β -MHC, exacerbação do desempenho funcional sistólico e importantes alterações diastólicas.

Muito embora numerosos agentes causais sejam presentes na obesidade, o preceito inicial do presente trabalho se pautou na participação da ativação de receptores AT_1 na promoção de remodelação cardíaca nos animais obesos. Em consideração aos mecanismos potencialmente envolvidos no princípio de alterações adaptativas miocárdicas, contudo, verificou-se ocorrência de reduzida expressão de Ang-II no miocárdio de ratos obesos. A menor concentração cardíaca de Ang-II indica que a formação peptídica local esteja reduzida e/ou que a degradação protéica esteja ampliada. Para contrabalançar os efeitos da exacerbação do SRA derivados da obesidade, carreando alterações adaptativas comuns à remodelação cardíaca, a ação da ECA-2 pode ter se ampliado na busca de se amortizar a sinalização provinda do acoplamento da Ang-II exógena junto ao receptor⁽¹²⁸⁾. Dentre os diversos agentes que controlam o processo proliferativo do miocárdio, inclui-se o balanço entre Ang-II (1-8), resultante da ação da ECA sobre o decapeptídeo Ang-I, e Ang-(1-7), formada a partir da clivagem da Ang-II pela ação da ECA-2^(17, 127). A ação de peptídeos de Ang-(1-7), justaposta ao receptor *Mas*, determina respostas fisiológicas vasodilatadoras e anti-proliferativas, interagindo negativamente com vias ativadas pelo acoplamento da Ang-II no receptor AT_1 ⁽¹²⁸⁾ e amortizando a neo-formação local de Ang-II, via ECA⁽¹⁶²⁾. Portanto, por meio de cascatas adjacentes principiadas no peptídeo Ang-(1-7), a ECA-2 pode modular os efeitos fisiopatológicos mediados pela Ang-II no coração

^(162, 163). Em favor dessa premissa, Burrell et al. ⁽¹⁶⁴⁾ mostraram que a atividade de ECA-2 é ampliada após o infarto agudo do miocárdio, sugerindo que essa enzima configura um modulador negativo do SRA, após a injúria miocárdica. Indicadores de remodelação cardíaca como hipertrofia miocitária e fibrose intersticial, se associaram com elevada expressão gênica e atividade de ECA-2 em ratos ⁽¹⁶⁵⁾. Por outro lado, o consumo de frutose, um importante nutriente presente na dieta hipercalórica ^(50, 53), está associado com a síntese de receptores AT₁, num evento paralelo à influência do SRA ⁽¹⁶⁶⁾. Em consequência, a maior expressão de receptores AT₁ poderia potencializar mecanismos procedentes do acoplamento da Ang-II, aumentando também a expressão e atividade da ECA-2. Logo, admite-se que mecanismos de degradação possam fundamentar a menor expressão de Ang-II no coração de ratos obesos; porém, em razão de estas proposições serem apenas conjecturas, novos estudos poderão melhor esclarecer estes achados.

Em relação às demais vias de sinalização, a obesidade se associou com maior expressão de ERK e redução da expressão de JNK (Figuras 9B e 9C). As MAPK podem ser estimuladas por inúmeros e diversos agentes ⁽¹³⁻¹⁵⁾; as proteínas JNK e p38-quinase (p38K) configuram mensageiros moleculares com maior sensibilidade a estímulos mecânicos, como vigente na hipertensão arterial ^(14, 15). Diferentemente, a ativação da ERK revela-se mais subordinada à ação de fatores de crescimento com acionamento *tirosina-quinase* subsequente, por exemplo, à ação do hormônio do crescimento, insulina, leptina e Ang-II ^(13, 15). Portanto, desajustes endócrinos específicos, como a hiperinsulinemia, hiperleptinemia e exacerbação do SRA, ou interativos, como no *cross-talk* molecular entre mecanismos hormonais paralelos, podem ativar a MAPK-ERK e configurar potenciais causas de remodelação cardíaca em ratos obesos. Sob estas considerações, o aumento da expressão de ERK no grupo OB é, provavelmente, resultante de mecanismos de ativação interativa, principiados pela insulina, leptina e processos moleculares dependentes do eixo AT₁ / proteína G ⁽¹³⁻¹⁵⁾.

A redução da JNK no grupo OB comparado ao C configura um achado intrigante. A ativação do ERK consiste de uma importante via de promoção de hipertrofia cardíaca, por

meio da estimulação de fatores nucleares de células T ativadas (NFAT) e subsequente transcrição de genes nucleares, como GATA-4 ⁽¹³⁻¹⁵⁾ (Figura 2). Esta cascata de sinalização desencadeia alterações fenotípicas, de padrão fetal, comuns ao remodelamento cardíaco patológico, como síntese de isoforma β -MHC e fibrose intersticial ⁽¹⁻⁴⁾. Em geral, o acionamento de MAPKs repercute em inúmeros mecanismos de autorregulação, mediados pela especificidade e magnitude da sinalização bioquímica, aliados à ação de proteínas fosfatases (MKP) ⁽¹⁵⁾. Neste contexto, a vigência de estímulos específicos direcionados à via ERK pode ter culminado em supressão bioquímica da atividade de outros membros de MAPK, como a JNK. A atividade de JNK é contrarregulada pelas isoformas de fosfatases MKP-1 e MKP-5, as quais são fosforiladas por ERK 1/2 e inibem, especificamente, as ações de JNK e p-38K ⁽¹⁶⁷⁾. Além disso, a ativação do TGF- β configura outro possível agente de estimulação da expressão de MKP-1 ⁽¹⁶⁸⁾. Cabe ressaltar que este peptídeo é ativado pela Ang-II e está envolvido na promoção de fibrose intersticial ^(47, 134, 146).

Portanto, o comportamento da ERK aliado à JNK sugere que fatores de crescimento, como insulina e leptina, possam reger o processo de remodelação cardíaca na obesidade. A ocorrência de hiperinsulinemia e hiperleptinemia se consolidou na ausência de alterações importantes da pressão arterial sistólica nos animais obesos.

Aliado a estas considerações, os resultados revelaram que a expressão do receptor de insulina, ativado sob a fosforilação de resíduos de tirosina nas posições 1162 e 1163 está ampliada, ainda que a expressão total se apresente alterada (Figura 10A e 10B). Esses achados sustentam que a hiperinsulinemia está envolvida na ativação de MAPK-ERK e promoção de respostas proliferativas no miocárdio de ratos obesos. O acoplamento da insulina induz o acionamento da atividade intrínseca de *tirosina-quinase* nas subunidades β do receptor ⁽²¹⁾. Este mecanismo é derivado de um processo de autofosforilação estrutural, no qual uma subunidade promove a fosforilação de diversos resíduos de tirosina da outra porção. No miocárdio, em duas principais cascatas bioquímicas subjacentes e paralelas ao sarcolema, o receptor fosforilado

estimula, via resíduos de tirosina, dois membros da família de IRS (IRS-1 e IRS-2) e o mensageiro *Shc* ⁽²¹⁾. Por meio destes recrutamentos moleculares distintos, tem-se a estimulação respectiva de dois importantes eixos moleculares: *IRS/ PI3K/ Akt* e *Shc/ Ras/ ERK* ^(12, 19, 21). Recentes evidências têm mostrado que a resistência insulinêmica configura um processo heterogêneo, com inibição de respostas metabólicas fomentadas pelo eixo *IRS/ PI3-K/ Akt* e exacerbação de efeitos ativados pela cascata *Shc/ Ras/ ERK* ^(23, 25). Enquanto a via *IRS/ PI3-K/ Akt* é primordial no desígnio de hipertrofia fisiológica e respostas metabólicas, o acionamento de MAPK consolida-se em processos de proliferação patológica, induzidos também por Ang-II ⁽¹³⁻¹⁵⁾. Neste contexto, o aumento da expressão de ERK e hipertrofia miocárdica no grupo OB pode ser resultante de ativação conjunta da insulina, via ativação do eixo *Shc/ Ras/ ERK*, e Ang-II, por meio do receptor AT₁. Embora pouco estudado em modelos de obesidade exógena, estes mecanismos interativos foram comprovados no miocárdio de ratos obesos *Zucker* ⁽⁴⁶⁾.

Considerando-se a via bioquímica transdutora de respostas metabólicas derivadas da insulina, o presente estudo analisou também a expressão peptídica do PI3K. Embora a expressão total deste mensageiro tenha se ampliado, esta condição não repercutiu em maior fosforilação de resíduos de tirosina (Figura 11A e 11B). Portanto, o quadro de resistência sistêmica à insulina mostra-se extensivo ao miocárdio, com envolvimento do PI3K, o principal mediador das ações metabólicas da insulina ⁽²¹⁾. Os mecanismos citosólicos de resistência insulínica pós-receptor envolvem mensageiros sinalizadores ativados pela insulina, incluindo, primordialmente, proteínas IRS e o agente PI3K, componentes da via metabólica da insulina; estas afecções citosólicas configuram as causas principais de resistência insulínica na obesidade ^(24, 25). Nesta perspectiva, os processos inibitórios da sinalização insulínica, com localização pós-receptor ^(141, 169) incluem: ampliada fosforilação de resíduos de serina/ threonina (*Ser/Thr*) do IRS-1 ⁽¹⁶⁷⁾; degradação de proteínas IRS ⁽¹⁷⁰⁾, maior atividade de fosfatases de resíduos de tirosina ⁽¹⁷¹⁾ e atenuada sensibilização de peptídeos ativados pela insulina, como PI3K, AKT e PKC ζ ^(33, 169). Estes eventos citosólicos culminariam em mecanismos inibitórios da sinalização

insulínica, suportados pela menor associação do IRS-1 com o segundo mensageiro PI3K, caracterizando, assim, o quadro de resistência hormonal ⁽²⁵⁾. Entre efetores heterólogos de dessensibilização insulínica, alinham-se peptídeos componentes de cascatas de sinalização estimuladas por adipocitocinas inflamatórias ^(18, 24, 25), ácidos graxos ^(28, 29), estresse celular ⁽²³⁾, aminoácidos ^(23, 28), endotelina-1 ⁽²³⁾, estresse oxidativo ⁽⁶⁾ e angiotensina II ⁽⁵⁻⁹⁾. Diversas evidências têm mostrado que estes agentes, em maior ou menor grau, são potencializados na obesidade e, mediante mecanismos de *cross-talk* interativo, podem modular respostas insulínicas dependentes do acionamento em tirosina.

Assim sendo, os resultados relacionados com os peptídeos ativados pela insulina permitem concluir que a obesidade se associa com ocorrência de resistência à insulina no miocárdio, pautados, provavelmente, na menor ativação do PI3K pelo receptor de insulina. Dentre as hipóteses iniciais, o presente estudo se firmou na estimulação de receptores AT₁ como mecanismo acionador de remodelação miocárdica em ratos obesos. De fato, os presentes resultados indicam que o bloqueio de receptores AT₁, mediado por losartan, propicia diminuição da pressão arterial sistólica, aumento da frequência cardíaca, reversão de indicadores de remodelação miocárdica e normalização de MAPK-ERK no miocárdio de ratos obesos. Em consideração a pressão arterial, o losartan reduziu os níveis pressóricos de ambos os grupos C+Los e OB+Los. O acionamento do receptor AT₁ pela Ang-II canaliza inúmeros efeitos pliotrópicos deste hormônio, como vasoconstrição periférica, secreção de aldosterona, reabsorção de sódio e retenção líquida renal, os quais culminam em hipertensão arterial ^(6, 12). O antagonismo do receptor AT₁, ao diminuir a resistência periférica, promove vasodilatação, ampliando o fluxo sanguíneo do tecido muscular esquelético, o que favorece o acesso e a captação glicêmica ⁽⁴¹⁾. Estes benefícios conferem adicional suporte à normalização do metabolismo glicêmico concomitante ao efeito hipotensor do losartan, constatados no grupo OB+Los. Em modelos de obesidade induzida por dieta de cafeteria ⁽⁴⁷⁾ e por dieta enriquecida com frutose ⁽⁷⁵⁾, os autores constataram que o bloqueio de receptores AT₁ resultou em

normalização de índices pressóricos e do metabolismo glicêmico.

O efeito hipotensor do losartan mostrou-se associado com ampliação da frequência cardíaca em ambos os grupos tratados. A redução aguda ou crônica da pressão arterial, com frequência, determina a ativação de uma série de mecanismos interconectados voltados ao restabelecimento dos níveis pressóricos ⁽⁶⁶⁾. Neste contexto, a elevação da frequência cardíaca decorre de um aumento da demanda do sistema nervoso autonômico simpático aliado à inibição do sistema nervoso autonômico parassimpático, via barorreceptores arteriais, visando compensar a diminuição da resistência periférica ⁽⁶⁶⁾. Em associação, o bloqueio da Ang-II culmina em normalização da hipertrofia e do desempenho sistólico ventricular no grupo OB+Los em relação ao C+Los. Considerando-se ambos os grupos, o losartan alterou o rendimento diastólico, por meio de concomitantes reduções na relação E/A, TRIV e R-R, ainda que não afetem as variações de relaxamento contrátil decorrentes da condição biométrica (Tabela 8).

Na análise estrutural e funcional *in vivo*, pelo ecocardiograma, é importante se considerar o balanço entre acionamento do sistema nervoso simpático e o bloqueio do receptor AT₁. Nos grupos sob losartan, a ampliada oferta intracelular de cálcio resultante da ativação simpática e maior frequência cardíaca é um contraponto ao tamponamento do receptor AT₁, o que ameniza, em parte, o trânsito citosólico de cálcio. Quanto ao desempenho funcional, como o rendimento cardíaco sistólico foi normalizado no grupo OB+Los, é admissível que a intervenção farmacológica atenua o inotropismo miocárdico na obesidade, por meio da diminuição do recrutamento miofibrilar e do número de sarcômeros. A amortização da hipertrofia miocárdica foi comprovada por achados macro e microscópicos. Esses achados morfológicos, conjugados a atenuação da função sistólica no grupo OB+Los, são resultantes da menor ativação do eixo Ang-II/ AT₁/ MAPKs, consubstanciada por atenuação da expressão de ERK e aumento de JNK após a administração de losartan na obesidade. Em favor dessa premissa, os níveis de Ang-II se mostram reduzidos sob a influência do losartan. Outros estudos já mostraram que o losartan, na dosagem de 30 mg/kg/dia, inibe a atividade da enzima conversora de angiotensina 1, culminando

em menor formação de Ang-II no miocárdio ^(10, 47). Em adição, a maior atividade de ECA-2, potencializada pelo bloqueio de receptores AT₁, favoreceria a sinalização por meio de receptores Mas ⁽¹⁶²⁾. Considerando-se o desempenho diastólico, as alterações derivadas da medicação mantêm relação com o aumento do ritmo contrátil. Assim, a maior frequência de incursões sistólicas está relacionada com menores intervalos de relaxamento isovolumétrico. No entanto, a conservação de diferenças atreladas à condição biométrica sugere que outros mecanismos, não vinculados ao acionamento de receptores AT₁ possam acometer o desempenho diastólico. A maior oferta intracelular de cálcio decorrente da hiper-ativação simpática conjugada a deficiências no resgate iônico ^(48, 53) durante o relaxamento constituem, provavelmente, os agentes responsáveis por esses distúrbios.

Similar à hipertrofia ventricular, a deposição intersticial de colágeno foi amenizada sob o bloqueio antagonista de receptores AT₁. Em estudos clínicos ^(172, 173) e experimentais ⁽¹⁷⁴⁾, o acúmulo intersticial de colágeno tem se associado com acionamento de receptores AT₁. A estimulação mecânica e/ou bioquímica de receptores AT₁ tem inúmeros efeitos profibróticos no miocárdio, como hiperplasia de fibroblastos, diferenciação de miofibroblastos, síntese de colágeno e inibição de MMPs ⁽¹⁴⁶⁾. Levando-se em conta a remodelação cardíaca, o acúmulo de fibras colágenas mostra-se diretamente relacionado com o grau de hipertrofia ventricular ⁽¹⁴⁶⁾; portanto, a administração de losartan culminou em reversão dos índices morfométricos indicadores de remodelação miocitária na obesidade. Interessantemente, evidências preliminares do presente trabalho, obtidas por Western-Blot, revelaram manutenção da expressão de colágeno do tipo I e redução da expressão de colágeno do tipo III, em ratos obesos (dados não-apresentados). Este cenário sugere que a remodelação intersticial também engloba modificações na relação entre variedades intersticiais de colágeno. Novas análises serão conduzidas para melhor esclarecer estas questões.

Contrastando com os demais indicadores de remodelação cardíaca, a composição de MHCs não foi afetada pela administração de losartan. Ampliações na síntese de isoformas β -

MHC constituem indicadores típicos de processos patológicos de remodelação cardíaca^(2, 3, 149). Entretanto, é pouco provável que o eixo funcional Ang-II/ AT₁/ MAPK-ERK seja regente único da remodelação cardíaca derivada da obesidade induzida por dieta. Vias sinalizadoras fomentadas por outros agentes bioquímicos, como hiperleptinemia e demais adipocitocinas inflamatórias, são potencialmente relacionadas com a designação do fenótipo cardíaco na obesidade⁽¹⁴³⁾. Além disso, atributos específicos às dietas hipercalóricas, como sobrecarga sacarídea e/ou lipídica, podem também propiciar ocorrência de ampliação de β -MHC^(45, 51). Em particular, considerando-se a ampliada atividade simpática do grupo OB+Los em resposta ao losartan, é plausível que os índices inalterados de MHC possam resultar da exacerbada atividade eletrofisiológica do miocárdio e/ou maior sensibilidade ao cálcio intracelular⁽¹⁵⁵⁻¹⁵⁷⁾.

Portanto, os resultados relativos ao perfil cardiovascular ratificaram parcialmente a hipótese do presente trabalho, em relação à remodelação cardíaca. O losartan ocasionou reversão da hipertrofia miocárdica, normalização do rendimento contrátil sistólico e da sinalização de MAPK secundária ao acionamento do receptor AT₁. Entretanto, a manutenção de ampliada concentração de β -MHC e de variações do desempenho diastólico ventricular frente a intervenção farmacológica mostra que outros atributos governam a remodelação cardíaca derivada da obesidade.

Em relação a participação do receptor AT₁ na promoção de resistência a insulina na obesidade, a administração de losartan culminou em maior fosforilação em tirosina do receptor e da PI3K, aperfeiçoando a sinalização insulínica no miocárdio em ambos os grupos tratados. A Ang-II configura um modulador heterólogo da sinalização insulínica, designando mecanismos intracelulares, proximais e distais a membrana sarcolemal, na promoção de resistência à insulina⁽⁵⁻⁹⁾. A redução da fosforilação em tirosina e/ou o aumento da fosforilação em serina da subunidade β do receptor de insulina e do IRS-1 foram propostos como mecanismos moleculares de resistência a insulina⁽¹⁸⁾. Como referido na seção introdutória, os principais efeitos da Ang-II são mediados pelo acoplamento com receptores AT₁, com

subsequente acionamento de proteínas $G_{q/11}$, levando à ativação de fosfolipase C e geração de segundos mensageiros diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP_3)^(4, 11). Estes agentes estimulam, então, a atividade da proteína quinase C (PKC), mobilizando a liberação intracelular de íons Ca^{+2} ^(10, 11) e ativação de MAPKs. Neste eixo de sinalização bioquímica, inúmeros membros, como DAG, PKC, além das MAPK, configuram hastes de modulação inibitória sobre cascatas insulínicas, por meio de fosforilação e inativação de proteínas IRS⁽²³⁾, prejudicando a fosforilação do mensageiro PI3K. Todos esses agentes configuram mensageiros interativos e são ativados por inúmeros processos modulatórios, incluindo ácidos graxos e agentes inflamatórios⁽²⁹⁾.

Em adição, evidências recentes têm mostrado que o acionamento de receptores AT_1 pela Ang-II mantém-se conectado com vias sinalizadoras principiadas em receptores estimulados por fatores de crescimento e citocinas inflamatórias^(6, 8, 11). A ativação dos referidos receptores deriva de fosforilação em resíduos de tirosina, orquestrando importantes eventos celulares, como proliferação e crescimento^(6, 17). Neste sentido, similar a insulina, a Ang-II também é capaz de estimular a fosforilação em tirosina do IRS-1 e do IRS-2⁽⁹⁾, por meio de acionamento do peptídeo *JAK-2*, membro da família de proteínas *janus-quinase*, também ativadas por adipocitocinas, como leptina e interleucinas⁽¹⁰⁴⁾. Esta cascata de sinalização deriva da ativação do AT_1 , visto que a sinalização da via JAK é também associada a receptores associados a proteína G⁽⁹⁾. Entretanto, de modo antagônico a insulina, a atividade da PI3K associada a ação das proteínas IRS é progressivamente diminuída após o estímulo da Ang-II⁽³⁰⁾. Como mecanismos distais de resistência citosólica à insulina, seguindo o acionamento da via JAK/STAT, a ativação de peptídeos SOCS mostrou antagonizar as ações insulínicas por inibição da fosforilação em tirosina e também por degradação proteossômica dos mensageiros IRS-1 e IRS-2^(9, 23, 29).

Além destes mecanismos, o acoplamento da Ang-II junto ao receptor AT_1 também se associa com estresse oxidativo, via ampliada atividade da NADPH oxidase, e

consequente produção de espécies reativas de oxigênio e ativação de mediadores inflamatórios, como fator nuclear de gene amplificador kappa de células B (NFκB) ⁽⁶⁾. Estes eventos regem a formação de outros agentes inflamatórios como proteína C reativa, citocinas e moléculas de adesão, que podem causar disfunção endotelial e resistência insulínica ⁽⁶⁾. Nesta perspectiva, o acúmulo de citocinas pró-inflamatórias, derivada da ação da Ang-II, configura um terceiro mecanismo de resistência à insulina ⁽⁸⁾. Estes agentes induzem a ativação de MAPKs no tecido vascular de humanos ⁽³³⁾, ratos ⁽¹⁷⁵⁾ e camundongos ⁽¹⁷⁶⁾ com supra-ativação do SRA.

Sob estas considerações, é certo que o bloqueio de receptores AT₁ ameniza a resistência a insulina na obesidade. O metabolismo sistêmico e miocárdico da insulina são conjuntamente favorecidos com a administração de losartan. Entretanto, a existência de inúmeras vias de integração molecular, principiadas nos receptores AT₁, dificulta a delimitação precisa sobre qual o principal mecanismo de promoção de resistência à insulina no miocárdio. Muito embora a maior expressão de ERK na obesidade sugira que a via AT₁/ DAG/ PKC/ MAPK seja mentora de distúrbios insulinêmicos, outros mecanismos debatidos, como a cascata JAK/ STAT e estresse oxidativo, mostram-se também associados à ativação de MAPK-ERK. Oportunamente, análises adicionais envolvendo marcadores peptídicos das vias suscitadas serão importantes para esclarecer estas intercorrências.

Aliada a esta limitação, partindo-se do desenvolvimento e conclusão do presente trabalho, emanaram-se inúmeras questões. Primariamente, é importante destacar que os presentes achados apenas sugerem que a maior adiposidade se associa com exacerbação do sistema renina-angiotensina. Subsídios para elucidar esta pendência seriam procedentes de múltiplas análises, envolvendo indicadores enzimáticos, como renina, ECA e ECA-2, além de variáveis peptídicas, especialmente angiotensinogênio, Ang-II e Ang-(1-7), no tecido adiposo e no meio circulante. Em analogia, as atividades de ECA e ECA-2 bem como expressão de receptores AT₁ no miocárdio seriam potencialmente necessárias.

Demais limitações decorrem da natureza multifatorial do modelo dietético

experimental e da própria condição de obesidade. Embora a composição das dietas experimentais seja pautada nos hábitos nutricionais humanos, a importância isolada de cada componente na promoção de anormalidades nutricionais, metabólicas e cardiovasculares é extremamente nebulosa. Em analogia, além do SRA, a vigência de inúmeras desordens sistêmicas, como inflamação e ativação do sistema neurohormonal, podem também se relacionar com os distúrbios derivados da maior adiposidade. A ocorrência de expressão de β -MHC e alterações de desempenho ventricular diastólico mostram-se associados com outros agentes, indiretamente relacionados ao SRA e/ou acionamento de receptores AT_1 . Novos e esclarecedores trabalhos são evidentemente necessários.

5. CONCLUSÃO

Consolidando a hipótese projetada inicialmente, as evidências obtidas permitem concluir que a obesidade exógena está associada com anormalidades de natureza metabólica, endócrina e cardiovascular, inclusive, com ocorrência de remodelação e resistência à insulina no coração. Levando-se em conta que a maioria destas respostas foi amainada com o bloqueio antagonista de receptores AT_1 , conclui-se que o acionamento do AT_1 configura um mecanismo crucial na promoção dessas desordens secundárias à obesidade induzida por dieta.

6. REFERÊNCIAS *

1. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N, Int Forum Cardiac R. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: A consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35(3):569-82.
2. Swynghedauw B. Phenotypic plasticity of adult myocardium: molecular mechanisms. *J Exp Biol*. 2006;209(12):2320-7.
3. Selvetella G, Hirsch E, Notte A, Tarone G, Lembo G. Adaptive and maladaptive hypertrophic pathways: points of convergence and divergence. *Cardiovasc Res*. 2004;63(3):373-80.
4. Barry S, Davidson S, Townsend P. Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *Int J Biochem Cell*. 2008;40(10):2023-39.
5. Calegari VC, Alves M, Picardi PK, Inoue RY, Franchini KG, Saad MJA, et al. Suppressor of cytokine signaling-3 provides a novel interface in the cross-talk between angiotensin II and insulin signaling systems. *Endocrinology*. 2005;146(2):579-88.
6. Cooper S, Whaley-Connell A, Habibi J, Wei Y, Lastra G, Manrique C, et al. Renin-angiotensin-aldosterone system and oxidative stress in cardiovascular insulin resistance. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2007;293(4):H2009-H23.
7. Maharsy WM, Kadi LN, Issa NG, Bitar KM, Der-Bogbossian AH, Abrahamian R, et al. Cross-talk related to insulin and angiotensin II binding on myocardial remodelling in diabetic rat hearts. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2007;8(2):59-65.
8. Olivares-Reyes J, Arellano-Plancarte A, Castillo-Hernandez J. Angiotensin II and the development of insulin resistance: Implications for diabetes. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;302(2):128-39.

* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references. [homepage on the Internet]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine;2003. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html Ms. Washington, 2003. 240p.

9. Carvalho-Filho MA, Carvalheira JBC, Velloso LA, Saad MJA. Cross-talk das vias de sinalização de insulina e angiotensina II: implicações com a associação entre diabetes mellitus e hipertensão arterial e doença cardiovascular. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007;51(2):195-203.
10. Dostal D. The cardiac renin-angiotensin system: novel signaling mechanisms related to cardiac growth and function. *Regul Pept.* 2000;91(1-3):1-11.
11. Levy BI. How to explain the differences between renin angiotensin system modulators. *Am J Hypertens.* 2005;18(9):134S-41S.
12. Reudelhuber T, Bernstein K, Delafontaine P. Is angiotensin II a direct mediator of left ventricular hypertrophy? Time for another look. *Hypertension.* 2007;49(6):1196-201.
13. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004;68(2):320-44.
14. Wang Y. Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases. *Circulation.* 2007;116(12):1413-23.
15. Rose BA, Force T, Wang Y. Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: angels versus demons in a heart-breaking tale. *Physiol Rev.* 2010;90(4):1507-46.
16. Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature.* 2002;415(6868):206-12.
17. Palomeque J, Delbridge L, Petroff MV. Angiotensin II: a regulator of cardiomyocyte function and survival. *Front Biosci.* 2009;1(14):5118-33.
18. Greenfield JR, Campbell LV. Insulin resistance and obesity. *Clin Dermatol.* 2004;22(4):289-95.
19. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001;414(6865):799-806.
20. Boirie Y, Short KR, Ahlman B, Charlton M, Nair KS. Tissue-specific regulation of mitochondrial and cytoplasmic protein synthesis rates by insulin. *Diabetes.* 2001;50(12):2652-8.
21. Bertrand L, Horman S, Beauloye C, Vanoverschelde J. Insulin signalling in the heart.

Cardiovasc Res. 2008;79(2):238-48.

22. Sugden PH, Clerk A. Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cell Signal*. 1997;9(5):337-51.
23. Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti J. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie*. 2005;87(1):99-109.
24. Govindarajan G, Alpert M, Tejwani L. Endocrine and metabolic effects of fat: Cardiovascular implications. *Am J Med*. 2008;121(5):366-70.
25. Choi K, Kim YB. Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Korean J Intern Med*. 2010;25(2):119-29.
26. Mensah GA, Mokdad AH, Ford E, Narayan KMV, Giles WH, Vinicor F, et al. Obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes: emerging epidemics and their cardiovascular implications. *Cardiol Clin*. 2004;22(4):485-504.
27. Segura J, Ruilope LM. Obesity, essential hypertension and renin-angiotensin system. *Public Health Nutr*. 2007;10(10A):1151-5.
28. Schenk S, Saberi M, Olefsky J. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest*. 2008;118(9):2992-3002.
29. Qatanani M, Lazar M. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes & Development*. 2007;21(12):1443-55.
30. Engeli S, Schling P, Gorzelniak K, Boschmann M, Janke E, Ailhaud G, et al. The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;35(6):807-25.
31. Cooper R, McFarlaneAnderson N, Bennett FI, Wilks R, Puras A, Tewksbury D, et al. ACE, angiotensinogen and obesity: A potential pathway leading to hypertension. *J Hum Hypertens*. 1997;11(2):107-11.
32. Goodfriend TL, Kelley DE, Goodpaster BH, Winters SJ. Visceral obesity and insulin resistance are associated with plasma aldosterone levels in women. *Obes Res*. 1999;7(4):355-62.

33. Richey JM, Ader M, Moore D, Bergman RN. Angiotensin II induces insulin resistance independent of changes in interstitial insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1999;277(5):E920-6.
34. Campbell DJ, Duncan AM, Kladis A, Harrap SB. Angiotensin peptides in spontaneously hypertensive and normotensive donryu rats. *Hypertension.* 1995;25(5):928-34.
35. Crandall DL, Herzlinger HE, Saunders BD, Armellino DC, Kral JG. Distribution of angiotensin-II receptors in rat and human adipocytes. *J Lipid Res.* 1994;35(8):1378-85.
36. Andreozzi F, Laratta E, Sciacqua A, Perticone F, Sesti G. Angiotensin II impairs the insulin signaling pathway promoting production of nitric oxide by inducing phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on Ser(312) and Ser(616) in human umbilical vein endothelial cells. *Circ Res.* 2004;94(9):1211-8.
37. Feldman R. ACE inhibitors versus AT(1) blockers in the treatment of hypertension and syndrome X. *Can J Cardiol.* 2000;16(Sup E):E41-4.
38. Fogari R, Derosa G, Zoppi A, Rinaldi A, Lazzari P, Fogari E, et al. Comparison of the effects of valsartan and felodipine on plasma leptin and insulin sensitivity in hypertensive obese patients. *Hypertens Res.* 2005;28(3):209-14.
39. Ernsberger P, Johnson JL, Rosenthal T, Mirelman D, Koletsky RJ. Therapeutic actions of allylmercaptocaptopril and captopril in a rat model of metabolic syndrome. *Am J Hypertens.* 2007;20(8):866-74.
40. Furuhashi M, Ura N, Takizawa H, Yoshida D, Moniwa N, Murakami H, et al. Blockade of the renin-angiotensin system decreases adipocyte size with improvement in insulin sensitivity. *J Hypertens.* 2004;22(10):1977-82.
41. Henriksen EJ, Jacob S, Kinnick TR, Teachey MK, Krekler M. Selective angiotensin II receptor antagonism reduces insulin resistance in obese Zucker rats. *Hypertension.* 2001;38(4):884-90.
42. Duarte J, Martinez A, Bermejo A, Vera B, Gamez MJ, Cabo P, et al. Cardiovascular

effects of captopril and enalapril in obese Zucker rats. *Eur J Pharmacol.* 1999;365(2-3):225-32.

43. Toblli JE, Cao G, DeRosa G, Forcada P. Reduced cardiac expression of plasminogen activator inhibitor 1 and transforming growth factor beta(1) in obese Zucker rats by perindopril. *Heart.* 2005;91(1):80-6.

44. Carvalheira JBC, Calegari VC, Zecchin HG, Nadruz W, Guimaraes RB, Ribeiro EB, et al. The cross-talk between angiotensin and insulin differentially affects phosphatidylinositol 3-kinase- and mitogen-activated protein kinase-mediated signaling in rat heart: Implications for insulin resistance. *Endocrinology.* 2003;144(12):5604-14.

45. Lopaschuk GD, Folmes CD, Stanley WC. Cardiac energy metabolism in obesity. *Circ Res.* 2007;101(4):335-47.

46. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity.* 2007;15(4):798-808.

47. Du Toit EF, Nabben M, Lochner A. A potential role for angiotensin II in obesity induced cardiac hypertrophy and ischaemic/reperfusion injury. *Basic Res Cardiol.* 2005;100(4):346-54.

48. Lima-Leopoldo AP, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Carvalho RF, Nogueira CR, Nascimento AF, et al. Obesity induces upregulation of genes involved in myocardial Ca^{2+} -handling. *Braz J Med Biol Res.* 2008;41(7):615-20.

49. Oliveira Jr SA, Okoshi K, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Campos DH, Martinez PF, et al. Nutritional and cardiovascular profiles of normotensive and hypertensive rats kept on a high fat diet. *Arq Bras Cardiol.* 2009;93(5):526-33.

50. Oliveira Junior SA, Dal Pai-Silva M, Martinez PF, Campos DHS, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, et al. Differential nutritional, endocrine, and cardiovascular effects in obesity-prone and obesity-resistant rats fed standard and hypercaloric diets. *Med Sci Monit.* 2010;16(7):BR208-17.

51. Oliveira Junior SA, Dal Pai-Silva M, Martinez PF, Lima-Leopoldo AP, Campos DHS, Leopoldo AS, et al. Diet-induced obesity causes metabolic, endocrine and cardiac alterations in

spontaneously hypertensive rats. *Med Sci Monit.* 2010;16(12):BR367-73.

52. Leopoldo AS, Sugizaki MM, Lima-Leopoldo AP, Nascimento AF, Luvizotto RAM, Campos DHS, et al. Cardiac remodeling in a rat model of diet-induced obesity. *Can J Cardiol.* 2010;26(8):423-9.

53. Paulino EC, Ferreira JCB, Bechara LR, Tsutsui JM, Mathias Jr W, Lima FB, et al. Exercise training and caloric restriction prevent reduction in cardiac Ca^{2+} -handling protein profile in obese rats. *Hypertension.* 2010;56(4):629-35.

54. Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Sugizaki MM, Bruno A, Nascimento AF, Luvizotto RAM, et al. Myocardial dysfunction and abnormalities in intracellular calcium handling in obese rats. *Arq Bras Cardiol.* 2011;97(3):232-40.

55. Medei E, Lima-Leopoldo AP, Pereira-Junior PP, Leopoldo AS, Campos DHS, Raimundo JM, et al. Could a high-fat diet rich in unsaturated fatty acids impair the cardiovascular system? *Can J Cardiol.* 2010;26(10):542-8.

56. Nascimento AF, Luvizotto RAM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Seiva FR, Justulin Jr LA, et al. Long-term high-fat diet-induced obesity decreases the cardiac leptin receptor without apparent lipotoxicity. *Life Sci.* 2011;88(23-24):1031-8.

57. Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Sugizaki MM, Nascimento AF, Campos DHS, Luvizotto RAM, et al. Involvement of L-type calcium channel and serca2A in myocardial dysfunction induced by obesity. *J Cell Physiol.* 2011;226(11):2934-42.

81. Naderali E, Fatani S. The effects of fenofibrate on metabolic and vascular changes induced by chocolate-supplemented diet in the rat. *Eur J Pharmacol.* 2005;521(1-3):99-104.

59. Pinheiro A, Cunha A, Aguila M, Mandarin-De-Lacerda C. Beneficial effects of physical exercise on hypertension and cardiovascular adverse remodeling of diet-induced obese rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2007;17(5):365-75.

60. Wilson C, Tran M, Salazar K, Young M, Taegtmeyer H. Western diet, but not high fat diet, causes derangements of fatty acid metabolism and contractile dysfunction in the heart of

Wistar rats. *Biochem J.* 2007;406(3):457-67.

61. Preuss H, Elzein M, Knapka J, Macarthy P, Yousufi A, Gleim G, et al. Blood-pressure responses to sucrose ingestion in 4 rat strains. *Am J Hypert.* 1992;5(4):244-50.
62. Preuss H, Zein M, MacArthy P, Dipette D, Sabnis S, Knapka J. Sugar-induced blood pressure elevations over the lifespan of three substrains of Wistar rats. *J Am Coll Nutr.* 1998;17(1):36-47.
63. Malkesman O, Weller A. Two different putative genetic animal models of childhood depression-A review. *Prog Neurobiol.* 2009;88(3):153-69.
64. Panksepp J. Thoughts on the study of the cerebral representations of emotions in humans and animals. *Integ Physiol Behav Sci.* 1998;33(1):95-95.
65. Schmidt B, Schieffer B. Angiotensin II AT1 receptor antagonists. Clinical implications of active metabolites. *J Med Biochem.* 2003;46(12):2261-70.
66. Sica DA. Angiotensin receptor blockers: new considerations in their mechanisms of action. *Curr Conc Pharm Hypertens.* 2006;8(5):381-5.
67. Sica DA, Gehr TWB, Ghosh S. Clinical pharmacokinetics of losartan. *Clin Pharmacokinetics.* 2005;44(8):797-814.
68. Soldner A, Spahn-Langguth H, Palm D, Mutschler E. A radioreceptor assay for the analysis of AT₁-receptor antagonists. Correlation with complementary LC data reveals a potential contribution of active metabolites. *J Pharm Biomed Anal.* 1998;17(1):111-24.
69. Committee on Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the care and use of laboratory animals. Bethesda: National Institute of Health; 1985.
70. Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Luvizotto RAM, Nogueira CR, et al. Misclassification probability as obese or lean in hypercaloric and normocaloric diet. *Biol Res.* 2008;41(3):253-9.
71. Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Luvizotto RAM, Nogueira CR, et al. Ciclo de dietas hipercalóricas induz obesidade e co-morbidades em ratos

Wistar. *Arq Bras Endocr.* 2008;52(6):968-74.

72. Akyol A, McMullen S, Langley-Evans SC. Glucose intolerance associated with early-life exposure to maternal cafeteria feeding is dependent upon post-weaning diet. *Brit J Nutr.* 2011;24(1):1-15.

73. Johnson MM, Peters JP. An improved method to quantify nonesterified fatty-acids in bovine plasma. *J Anim Sci.* 1993;71(2):753-6.

74. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. *Diabetologia.* 1985;28(7):412-9.

75. Umeda M, Kanda T, Murakami M. Effects of angiotensin II receptor antagonists on insulin resistance syndrome and leptin in sucrose-fed spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2003;26(6):485-92.

76. Alves MF, Araujo MC, Juliano MA, Oliveira EM, Krieger JE, Casarini DE, et al. A continuous fluorescent assay for the determination of plasma and tissue angiotensin I-converting enzyme activity. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38(6):861-8.

77. Barauna VG, Magalhães FC, Krieger JE, Oliveira EM. AT1 receptor participates in the cardiac hypertrophy induced by resistance training in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008;295(2):R381-7.

78. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Frohlich ED. Validity of an indirect tail-cuff method for determining systolic arterial pressure in unanesthetized normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Lab Clin Med.* 1971;78(6):957-8.

79. Matsubara LS, Narikawa S, Ferreira ALA, Paiva SAR, Zornoff LAM, Matsubara BB. Remodelação miocárdica na sobrecarga crônica de pressão ou de volume no coração de ratos. *Arq Bras Cardiol.* 2006;86(2):126-30.

80. Gerdes AM, Liu Z, Zimmer HG. Changes in nuclear size of cardiac myocytes during the development and progression of hypertrophy in rats. *Cardioscience.* 1994;5(3):203-8.

81. Serra AJ, Higuchi ML, Ihara SSM, Antônio EL, Santos MH, Bombig MT, et al. Exercise training prevents β -adrenergic hyperactivity-induced myocardial hypertrophy and lesions. *Eur J Heart Fail.* 2008;10(6):534-39.
82. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54.
83. Talmadge RJ, Roy RR. Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *J Appl Physiol.* 1993;75(5):2337-40.
84. Reiser PJ, Kline WO. Electrophoretic separation and quantitation of cardiac myosin heavy chain isoforms in eight mammalian species. *Am J Physiol.* 1998;274(3Pt2):1048-53.
85. Vescovo G, Ceconi C, Bernocchi P, Ferrari R, Carraro U, Ambrosio GB, et al. Skeletal muscle myosin heavy chain expression in rats with monocrotaline-induced cardiac hypertrophy and failure. Relation to blood flow and degree of muscle atrophy. *Cardiovasc Res.* 1998;39(1):233-41.
86. Warren CM, Greaser ML. Method for cardiac myosin heavy chain separation by sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *Anal Biochem.* 2003;320(1):149-51.
87. Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LAM, Carvalho RF, Oliveira Junior SA, Lima ARR, et al. Chronic heart failure-induced skeletal muscle atrophy, necrosis, and changes in myogenic regulatory factors. *Med Sci Monit.* 2010;16(12):BR374-383.
88. Johnson RA, Wichern DW. *Applied multivariate statistical analysis.* New Jersey; Prefice-Hall 1998; 4th ed:p.816.
89. Norman GR, Streiner DI. *Biostatistics: the bare essentials.* St. Louis (Mosby) 1994.
90. Harrington M. Is junk food addictive? *Lab Anim.* 2010;39(5):126.
91. Esteve M, Immaculada R, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M. Effects of a cafeteria diet on energy intake and balance in Wistar rats. *Physiol Behav.* 1994;56(1):65-71.
92. Velkoska E, Warner F, Cole T, Smith I, Morris M. Metabolic effects of low dose angiotensin converting enzyme inhibitor in dietary obesity in the rat. *Nutrition Metabolism and*

Cardiovasc Dis. 2010;20(1):49-55.

93. Fox S, Meinen A, Pesik M, Landis M, Remington PL. Competitive food initiatives in schools and overweight in children: a review of the evidence. *WMJ*. 2005;104(5):38-43.
94. Caballero B. The global epidemic of obesity: an overview. *Epidemiol Rev*. 2007;29:1-5.
95. Schrauwen P, Westerterp KR. The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight. *Br J Nutr*. 2000;84(4): 417-27.
96. Flatt J. Carbohydrate balance and food-intake regulation. *Am J Clin Nutr*. 1995;62(1):155-6.
97. Relling D, Esberg L, Fang C, Johnson W, Murphy E, Carlson E, et al. High-fat diet-induced juvenile obesity leads to cardiomyocyte dysfunction and upregulation of Foxo3a transcription factor independent of lipotoxicity and apoptosis. *J Hypertens*. 2006;24(3):549-61.
98. Kong X, Zhang D, Wu H, Li F. Losartan and Pioglitazone Ameliorate Nephropathy in Experimental Metabolic Syndrome Rats. *Biol Pharm Bull*. 2011;34(5):693-9.
99. Boustany C, Brown D, Randall D, Cassis L. AT(1)-receptor antagonism reverses the blood pressure elevation associated with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;289(1):R181-R6.
100. Huisamen B, Perel S, Friedrich S, Salie R, Strijdom H, Lochner A. ANG II type I receptor antagonism improved nitric oxide production and enhanced eNOS and PKB/Akt expression in hearts from a rat model of insulin resistance. *Mol Cell Biochem*. 2011;349(1-2):21-31.
101. Rosselli M, Burgueno A, Carabelli J, Schuman M, Pirola C, Sookoian S. Losartan reduces liver expression of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) in a high fat-induced rat nonalcoholic fatty liver disease model. *Atherosclerosis*. 2009;206(1):119-26.
102. Trayhurn P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiol Scand*. 2005;184(4):285-93.
103. Waki H, Tontonoz P. Endocrine functions of adipose tissue. *Ann Rev Pathol*. 2007;2:31-

56.

104. Guilherme A, Virbasius J, Puri V, Czech M. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(5):367-77.

105. Moller D, Kaufman K. Metabolic syndrome: A clinical and molecular perspective. *Annu Rev Med.* 2005;56(1):45-62.

106. Sinitskaya N, Gormelen S, Schuster-Klein C, Guardiola-Lemaitre B, Pevet P, Challet E. Increasing the fat-to-carbohydrate ratio in a high-fat diet prevents the development of obesity but not a prediabetic state in rats. *Clin Sci.* 2007;113(9-10):417-25.

107. Russell J, Proctor S. Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol.* 2006;15(6):318-30.

108. Dietschy JM. Dietary fatty acids and the regulation of plasma low density lipoprotein cholesterol concentrations. *J Nutr.* 1998;128(2):444-8.

109. Ratnayake WM, L'Abbé MR, Mueller R, Hayward S, Plouffe L, Hollywood R, et al. Vegetable oils high in phytosterols make erythrocytes less deformable and shorten the life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Nutr.* 2000;130(5):1166-78.

110. Hamano M, Mashiko S, Onda T, Tomita I, Tomita T. Correlation analysis of blood pressure and platelet aggregation/vascular reactivity in SHRSP, WKY, F1 and backcross generations. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl.* 1995;22(1):107-8.

111. Hirano T, Ran J, Adachi M. Opposing actions of angiotensin II type 1 and 2 receptors on plasma cholesterol levels in rats. *J Hypertens.* 2006;24(1):103-8.

112. Ran J, Hirano T, Adachi M. Angiotensin II type 1 receptor blocker ameliorates overproduction and accumulation of triglyceride in the liver of Zucker fatty rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;287(2):E227-E32.

113. Tolonen H, Keil U, Ferrario M, Evans A, Project WM. Prevalence, awareness and treatment of hypercholesterolaemia in 32 populations: results from the WHO MONICA Project.

Int J Epidemiol. 2005;34(1):181-92.

114. Rajagopalan S, Brook R, Mehta R, Supiano M, Pitt B. Effect of losartan in aging-related endothelial impairment. *Am J Cardiol*. 2002;89(5):562-6.

115. Kristianson K, Fyhrquist F, Devereux R, Kjeldsen S, Lindholm L, Lyle P, et al. An analysis of cholesterol control and statin use in the Losartan intervention for Endpoint reduction in hypertension study. *Clin Ther*. 2003;25(4):1186-99.

116. Nashar K, Nguyen A, Jesri A, Morrow J, Egan B. Angiotensin receptor blockade improves arterial distensibility and reduces exercise-induced pressor responses in obese hypertensive patients with the metabolic syndrome. *Am J Hypertens*. 2004;17(6):477-82.

117. Derosa G, Cicero A, Bertone G, Piccinni M, Fogari E, Ciccarelli L, et al. Comparison of the effects of telmisartan and nifedipine gastrointestinal therapeutic system on blood pressure control, glucose metabolism, and the lipid profile in patients with type 2 diabetes mellitus and mild hypertension: A 12-month, randomized, double-blind study. *Clin Ther*. 2004;26(8):1228-36.

118. Ran J, Hirano T, Adachi M. Chronic ANG II infusion increases plasma triglyceride level by stimulating hepatic triglyceride production in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;287(5):E955-E61.

119. Doucet E, Cameron J. Appetite control after weight loss: what is the role of bloodborne peptides? *Appl Physiol Nutr Metab*. 2007;32(3):523-32.

120. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman J. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homolog. *Nature*. 1994;372(6505):425-32.

121. Cowley M, Smart J, Rubinstein M, Cordan M, Diano S, Horvath T, et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*. 2001;411(6836):480-4.

122. Spanswick D, Smith M, Groppi V, Logan S, Ashford M. Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels. *Nature*. 1997;390(6659):521-5.

123. Tune JD, Considine RV. Effects of leptin on cardiovascular physiology. *J Am Soc Hypertens.* 2007;1(4):231-41.
124. La Cava A, Alviggi C, Matarase G. Unraveling the multiples roles of leptin in inflammation and autoimmunity. *J Mol Med.* 2004;82(1):4-11.
125. Cassis L, Huang J, Gong M, Daugherty A. Role of metabolism and receptor responsiveness in the attenuated responses to Angiotensin II in mice compared to rats. *Regul Pept.* 2004;117(2):107-16.
126. Masuo K, Mikami H, Ogihara T, Tuck M. Weight reduction and pharmacologic treatment in obese hypertensives. *Am J Hypertens.* 2001;14(6):530-8.
127. Le T, Coffman T. Targeting genes in the renin-angiotensin system. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2008;17(1):57-63.
128. Shi L, Mao C, Xu Z, Zhang L. Angiotensin-converting enzymes and drug discovery in cardiovascular diseases. *Drug Discov Today.* 2010;15(9-10):332-41.
129. Yvan-Charvet L, Quignard-Boulange A. Role of adipose tissue renin-angiotensin system in metabolic and inflammatory diseases associated with obesity. *Kidney Int.* 2011;79(2):162-8.
130. Menard J, Bouhnik J, Clauser E, Richoux J, Corvol P. Biochemistry and regulation of angiotensinogen. *Clin Exp Hypertens A.* 1983;5(7-8):1005-19.
131. Lu H, Boustany-Kari C, Daugherty A, Cassis L. Angiotensin II increases adipose angiotensinogen expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;292(5):E1280-E7.
132. Bourgoin F, Bachelard H, Badeau M, Melancon S, Pitre M, Lariviere R, et al. Endothelial and vascular dysfunctions and insulin resistance in rats fed a high-fat, high-sucrose diet. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295(3):H1044-55.
133. Sedová L, Bérubé J, Gaudet D, Dumont M, Tremblay J, Hamet P, et al. Diet-induced obesity delays cardiovascular recovery from stress in spontaneously hypertensive rats. *Obes Res.* 2004;12(12):1951-8.
134. Boustany C, Bharadwaj K, Daugherty A, Brown D, Randall D, Cassis L. Activation of

the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;287(4):R943-9.

135. Carroll JF, Zenebe WJ, Strange TB. Cardiovascular function in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension*. 2006;48(1):65-72.

136. Roberts C, Barnard R, Sindhu R, Jurczak M, Ehdaie A, Vaziri N. A high-fat, refined-carbohydrate diet induces endothelial dysfunction and oxidant/antioxidant imbalance and depresses NOS protein expression. *J Appl Physiol*. 2005;98(1):203-10.

137. Chen G, Huang C, Chang M, Chen C, Chen S, Huang C, et al. Two unhealthy dietary habits featuring a high fat content and a sucrose-containing beverage intake, alone or in combination, on inducing metabolic syndrome in Wistar rats and C57BL/6J mice. *Metabolism*. 2011;60(2):155-64.

138. Roberts C, Berger J, Barnard R. Long-term effects of diet on leptin, energy intake, and activity in a model of diet-induced obesity. *J Appl Physiol*. 2002;93(3):887-93.

139. Bruder-Nascimento T, Baptista RFF, Pereira PC, Campos DHS, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, et al. Vascular alterations in high-fat diet-obese rats: role of endothelial L-arginine/ NO pathway. *Arq Bras Cardiol*. 2011;97(1):40-5.

140. Sato J, O'Brien T, Katusic Z, Fu A, Nygren J, Singh R, et al. Dietary antioxidants preserve endothelium dependent vasorelaxation in overfed rats. *Atherosclerosis*. 2002;161(2):327-33.

141. Kim J, Montagnani M, Koh K, Quon M. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction - Molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation*. 2006;113(15):1888-904.

142. Vecchione C, Maffei A, Colella S, Aretini A, Poulet R, Frati G, et al. Leptin effect on endothelial nitric oxide is mediated through Akt-endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway. *Diabetes*. 2002;51(1):168-73.

143. Abel ED, Litwin SE, Sweeney G. Cardiac remodeling in obesity. *Physiol Rev*.

2008;88(2):389-419.

144. Ricci MR, Levin BE: Ontogeny of diet-induced obesity in selectively bred Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;285(3):R610–18.

145. Gerdes AM. Cardiac myocyte remodeling in hypertrophy and progression to failure. *J Card Fail*. 2002;8(6):264-8.

146. Salazar BL, Albéniz SR, Guedón TA, Miqueo AG, Querejeta R, Martinez JD. Altered fibrillar collagen metabolism in hypertensive heart failure. Current understanding and future prospects. *Rev Esp Cardiol*. 2006;59(10):1047-57.

147. Zaman AKMT, Fujii S, Goto D, Furumoto T, Mishima T, Nakai Y, et al. Salutary effects of attenuation of angiotensin II on coronary perivascular fibrosis associated with insulin resistance and obesity. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;37(2):525-35.

148. Marinou K, Tousoulis D, Antonopoulos AS, Stefanadi E, Stefanadis C. Obesity and cardiovascular disease: from pathophysiology to risk stratification. *In J Cardiol*. 2010;138(1):3-8.

149. Rundell VL, Manaves V, Martin AF, De Tombe PP. Impact of beta-myosin heavy chain isoform expression on cross-bridge cycling kinetics. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(2):896-903.

150. Dhalla NS, Liu X, Panagia V, Takeda N. Subcellular remodeling and heart dysfunction in chronic diabetes. *Cardiovasc Res*. 1998;40(2):239-47.

151. Caiozzo VJ, Haddad F. Thyroid hormone: modulation of muscle structure, function, and adaptative responses to mechanical loading. *Exerc Sport Sci Rev*. 1996;24:321-61.

152. Swoap SJ, Gastelum C, Bodell P, Baldwin KM. Immunolocalization of rat cardiac beta-MHC protein expression in systemic hypertension and caloric restriction. *Am J Physiol*. 1994;269(4Pt1):C1034-41.

153. Alpert NR, Brosseau C, Federico A, Krenz M, Robbins J, Warshaw DM. Molecular mechanics of mouse cardiac myosin isoforms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(4):1446-54.

154. Krenz M, Sadayappan S, Osinska HE, Henry JA, Beck S, Warshaw DM, et al. Distribution and structure-function relationship of myosin heavy chain isoforms in the adult mouse heart. *J Biol Chem*. 2007;282(33):24057-64.
155. Carnes CA, Geisbuhler TP, Reiser PJ. Age-dependent changes in contraction and regional myocardial myosin heavy chain isoform expression in rats. *J Appl Physiol*. 2004;97(1):446-53.
156. Herring BP, Dixon S, Gallagher PJ. Smooth muscle myosin light chain kinase expression in cardiac and skeletal muscle. *Am J Physiol*. 2000;279(5):C1656-64.
157. Davis JS, Hassanzadeh S, Winitsky S, Lin H, Satorius C, Vemuri R, et al. The overall pattern of cardiac contraction depends on a spatial gradient of myosin regulatory light chain phosphorylation. *Cell*. 2001;107(5):631-41.
158. Bing OH, Conrad CH, Boluyt MO, Robinson KG, Brooks WW. Studies of prevention, treatment and mechanisms of heart failure in the aging spontaneously hypertensive rat. *Heart Fail Rev*. 2002;7(1):71-88.
159. Ommen SR, Nishimura RA, Appleton CP, Miller FA, Oh JK, Redfield MM, et al. Clinical utility of Doppler echocardiography and tissue Doppler imaging in the estimation of left ventricular filling pressures. A comparative simultaneous doppler-catheterization study. *Circulation*. 2000;102:1788-94.
160. Hueb JC, Hepner A, Hueb RAS, Okoshi K, Zanati SG, Matsubara BB. A intervenção coronária percutânea melhora a função diastólica do ventrículo esquerdo em pacientes com angina estável? *Rev Bras Ecocardiogr Imagem Cardiovasc*. 2011;24(4):29-34.
161. Lipskaia L, Chemaly ER, Hadri L, Lompre AM, Haijar RJ. Sarcoplasmic reticulum Ca(2+) ATPase as a therapeutic target for heart failure. *Expert Opin Biol Ther*. 2010;10(1):29-41.
162. Keidar S, Kaplan M, Gamliel-Lazarovich A. ACE2 of the heart: From angiotensin I to angiotensin (1-7). *Cardiovasc Res*. 2007;73(3):463-9.

163. Ferrario CM, Jessup J, Chappell MC, Averill DB, Brosnihan KB, Tallant EA, et al. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockers on cardiac angiotensin-converting enzyme 2. *Circulation*. 2005; 111(20):2605-10.
164. Burrell LM, Risvanis J, Kubota E, Dean RG, MacDonald PS, Lu S, et al. Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans. *Eur Heart J*. 2005;26(4):369-75.
165. Burchill L, Velkoska E, Dean RG, Lew RA, Smith AI, Levidiotis V, et al. Acute kidney injury in the rat causes cardiac remodelling and increases angiotensin-converting enzyme 2 expression. *Exp Physiol*. 2008;93(5):622-30.
166. Sodhi CP, Kanwar YS, and Sahai A. Hypoxia and high glucose upregulate AT1 receptor expression and potentiate ANG II-induced proliferation in VSM cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284(3):H846–52.
167. Kondoh K, Nishida E. Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(8):1227-37.
168. Mikami F, Lim JH, Ishinaga H, Ha UH, Gu H, Koga T, et al. The transforming growth factor-beta-Smad3/4 signaling pathway acts as a positive regulator for TLR2 induction by bacteria via a dual mechanism involving functional cooperation with NF-kappaB and MAPK phosphatase 1-dependent negative cross-talk with p38 MAPK. *J Biol Chem*. 2006;281(31):22397-408.
169. Draznin B. Molecular mechanisms of insulin resistance: serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and increased expression of p85alpha: the two sides of a coin. *Diabetes*. 2006;55(8):2392-7.
170. Shah OJ, Wang Z, Hunter T. Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. *Curr Biol*. 2004;14(18):1650-6.
171. Xue B, Kim YB, Lee A, Toschi E, Bonner-Weir S, Kahn CR, et al. Protein-tyrosine phosphatase 1B deficiency reduces insulin resistance and the diabetic phenotype in mice with

polygenic insulin resistance. *J Biol Chem.* 2007;282(33):23829-40.

172. López B, Querejeta R, Varo N, González A, Larman M, Martínez Ubago JL, et al. Usefulness of serum carboxy-terminal propeptide of procollagen type I to assess the cardioreparative ability of antihypertensive treatment in hypertensive patients. *Circulation.* 2001;104(3):286-91.

173. Díez J, Querejeta R, López B, González A, Larman M, Martínez Ubago JL. Losartan-dependent regression of myocardial fibrosis is associated with reduction of left ventricular chamber stiffness in hypertensive patients. *Circulation.* 2002;105(21):2512-7.

174. González A, López B, Querejeta R, Díez J. Regulation of myocardial fibrillar collagen by angiotensin II. A role in hypertensive heart disease? *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34(12):1585-93.

175. Wei Y, Whaley-Connell AT, Chen K, Habibi J, Uptergrove GM, Clark SE, et al. NADPH oxidase activation contributes to vascular inflammation, insulin resistance, and remodeling in the transgenic (mRen2) rat. *Hypertension* 2007;50(2):384–91.

176. Li C, Hu Y, Mayr M, Xu Q. Cyclic strain stress-induced mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 expression in vascular smooth muscle cells is regulated by Ras/Rac-MAPK pathways. *J Biol Chem.* 1999;274(36):25273-80.