

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS DE ARARAQUARA

**Participação de receptores AT1 no prosencéfalo na regulação da pressão  
arterial em animais tratados com dieta hiperlipídica**

JÉSSICA MATHEUS DE SÁ

Araraquara- SP

2016

JÉSSICA MATHEUS DE SÁ

**Participação de receptores AT1 no prosencéfalo na regulação da pressão arterial em animais tratados com dieta hiperlipídica**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação em  
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de  
Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da  
Universidade Estadual Paulista para  
obtenção do Grau de Farmacêutica- Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Débora Simões de Almeida Colombari

Araraquara – SP

2016

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1** - Sistema Renina-Angiotensina

**Figura 2** - Foto micrografia do encéfalo de um rato representativo

**Figura 3** - Alterações na pressão arterial média em ratos tratados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 3 semanas

**Figura 4** - Alterações na frequência cardíaca em ratos tratados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 3 semanas

**Figura 5** - Alterações no peso corporal em ratos tratados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 3 semanas

**Figura 6** - Tecido adiposo relativo em ratos tratados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 3 semanas

**Figura 7** - Alterações no lipidograma em ratos tratados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 3 semanas

**Figura 8** - Alterações na pressão arterial média em ratos tratados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas

**Figura 9** - Alterações na frequência cardíaca em ratos tratados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas

**Figura 10** - Alterações no peso corporal em ratos tratados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas

**Figura 11** - Tecido adiposo relativo em ratos tratados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas

**Figura 12** - Alterações no lipidograma em ratos tratados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas

## LISTA DE ABREVIATURAS

Aa - Aminoácido

ANG I – Angiotensina I

ANG II – Angiotensina II

AT1 – receptor de angiotensina do subtipo 1

AT2 – receptor de angiotensina do subtipo 2

bpm – batimentos por minuto

COL – Colesterol total

DH – Dieta hiperlipídica

DP – Dieta padrão

ECA – Enzima conversora de angiotensina

EPI – Epididimal

FC – Frequência cardíaca

HDL - Lipoproteína de alta densidade

MES – Mesentérico

NTS – Núcleo do trato solitário

OSF – Órgão subfornical

OVLT – Órgão vasculoso da lâmina terminal

PAM – Pressão arterial média

PAP – Pressão arterial pulsátil

PAS – Pressão arterial sistólica

PVN – Núcleo paraventricular do hipotálamo

RET – Retroperitoneal

RNAm – RNA mensageiro

RVL - Área rostroventrolateral do bulbo

SNC – Sistema nervoso central

SON - órgão subfornical

SRA – Sistema renina-angiotensina

TRI - Triglicérides

VL – Ventrículo lateral

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	<b>9</b>
1.1 Obesidade e epidemiologia .....	9
1.2 Obesidade e Sistema Renina-Angiotensina .....	10
1.3 ANG II e o prosencéfalo .....	13
<b>2. Objetivo geral</b> .....	<b>15</b>
2.1 Objetivos específicos .....	15
<b>3. Materiais e métodos</b> .....	<b>16</b>
3.1 Animais.....	16
3.2 Dietas .....	16
3.3 Implante de cânula no ventrículo lateral.....	17
3.4 Injeção de drogas no ventrículo lateral.....	17
3.5 Drogas injetadas no ventrículo lateral .....	18
3.6 Medidas da pressão arterial e frequência cardíaca agudamente .....	18
3.7 Coleta do tecido adiposo e encéfalo .....	19
3.8 Análises estatísticas.....	19
<b>4. Protocolos experimentais</b> .....	<b>20</b>
4.1 Dieta hiperlipídica e o bloqueio de receptores AT1 de Ang II no VL .....	20
4.2 Efeito da dieta hiperlipídica de 3 ou 6 semanas sobre parâmetros metabólicos ..	20
<b>5. Resultados</b> .....	<b>21</b>
5.1 Histologia.....	21

5.2 Efeito do bloqueio de receptores angiotensinérgicos do subtipo AT1 no prosencéfalo sobre as alterações de PAM e FC e alterações metabólicas em ratos tratados com dieta hiperlipídica por 3 semanas .....	22
5.3 Efeito do bloqueio de receptores angiotensinérgicos do subtipo AT1 no prosencéfalo sobre as alterações de PAM e FC e alterações metabólicas em ratos tratados com dieta hiperlipídica por 6 semanas .....	28
<b>6. Discussão e conclusão.....</b>	<b>34</b>
<b>7. Referências .....</b>	<b>36</b>

## RESUMO DO PROJETO

Neste projeto avaliamos as respostas cardiovasculares em ratos tratados com uma dieta hiperlipídica e estudamos a possível participação angiotensinérgica no prosencéfalo nessas respostas. Foram utilizados ratos Holtzman adultos (280-300 g) submetidos à dieta hiperlipídica (DH) ou dieta padrão (DP) por 3 ou 6 semanas. Nossos resultados demonstraram que o aumento de pressão arterial de ratos submetidos a DH por 3 semanas não se alterou após a microinjeção com losartan (antagonista de receptores angiotensinérgicos do subtipo AT1) no ventrículo lateral (VL). Com 3 semanas de DH não foram observadas alterações significantes na frequência cardíaca. Já em ratos submetidos a DH por 6 semanas, os níveis de pressão arterial e de frequência cardíaca que estavam mais elevados, retornaram aos níveis semelhantes aos dos ratos DP após a microinjeção de losartan no VL. Nos parâmetros metabólicos observamos que a DH promoveu um aumento no níveis de tecido adiposo (epididimal, retroperitoneal e mesentérico) e peso corporal comparado aos grupos DP. Portanto, nossos estudos sugerem que os receptores AT1 prosencefálicos parecem estar envolvidos com os níveis pressóricos mais elevados em animais tratados com DH por 6 semanas. Os mecanismos envolvidos com o aumento de pressão arterial em ratos submetidos por 3 semanas de DH serão objeto de estudos futuros.

## 1. INTRODUÇÃO

### ***1.1 Obesidade e epidemiologia***

A obesidade é definida como o acúmulo excessivo de gordura que traz prejuízos a saúde do indivíduo (WHO, 2016). Apontada como uma epidemia mundial (Mokdad et al., 2003), a obesidade vem se tornando um dos maiores problemas de saúde pública. No ano de 2014, mais de 1,9 bilhões de adultos estavam acima do peso, entre eles, 600 milhões de obesos, ou seja, 13% da população adulta (WHO, 2016). Esses dados, contudo, não se estendem apenas a população adulta: 41 milhões de crianças, abaixo dos 5 anos, estão acima do peso ou obesas no ano de 2014.

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a maioria da população vive em países em que o sobrepeso e obesidade levam a um maior índice de morte se comparado com o índice de morte por baixo peso. Nas últimas décadas, tem se atribuído alguns fatores ao ganho de peso, como o aumento da ingestão de alimentos altamente energéticos que são ricos em gordura e o aumento do sedentarismo, ou seja, diminuição da prática de atividade física, muitas vezes relacionada com a globalização que trouxe mudanças nas formas de transporte e natureza sedentária das formas de trabalho (WHO, 2016).

No Brasil, o estilo de vida adotado pela população tem se tornado semelhante ao de países desenvolvidos. Nos últimos 50 anos, com o êxodo da população rural para a área urbana, os cidadãos tornaram-se ansiosos, estressados e obesos com pouco foco na prática de atividade física (Neto et al., 2008). Dados no ministério da saúde demonstraram que 52,2% da população Brasileira estão

acima do peso ideal. O índice de obesidade na população masculina é de 56,5% enquanto nas mulheres é de 49,1%. A população jovem (18 a 24 anos) se destaca com melhor índice, 38%, enquanto pessoas de 45 a 64 anos ultrapassam os 61%. (saúde, 2015).

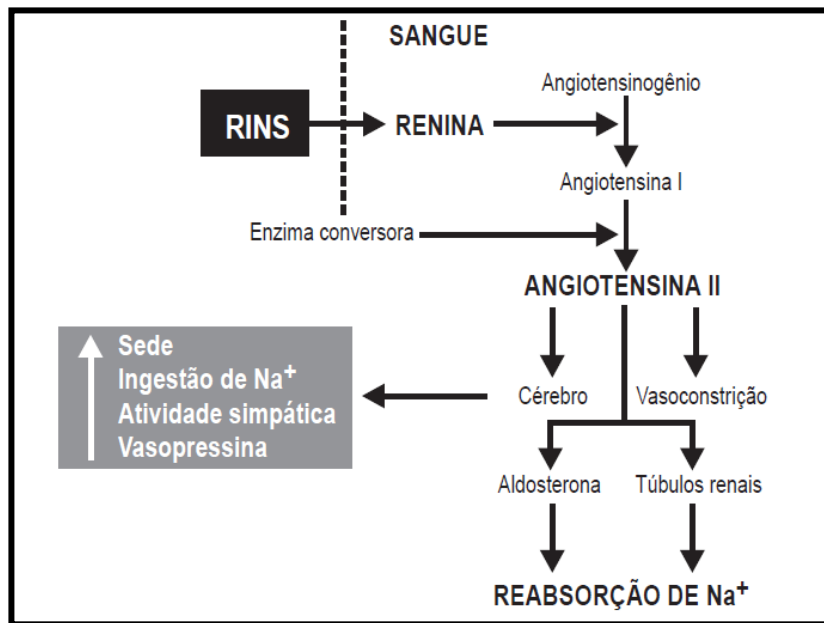
O aumento do sobrepeso e obesidade como consequência, pode levar a doenças como diabetes, desordens músculo-esqueléticas, alguns tipos de cânceres que incluem endometrial, ovariano, rins e fígado, além de doenças cardiovasculares, principalmente doenças cardíacas e acidente vascular cerebral, principais causas de morte entre obesos (WHO, 2016). Dentre as doenças cardiovasculares, a hipertensão é altamente prevalente em obesos [revisão em (Aghamohammadzadeh and Heagerty, 2012, Hall et al., 2015)] e estudos realizados em diversas populações do mundo demonstraram que a relação entre o IMC e as pressões diastólica e sistólica é quase linear (Hall, 2003).

## **1.2 Obesidade e Sistema Renina-Angiotensina**

O sistema renina-angiotensina (SRA) é composto por uma cascata em que através da produção de renina pelo rim, esta age sobre uma proteína plasmática o angiotensinogênio, liberando um peptídeo de 10 aa, a angiotensina I (ANG I). Após alguns segundos de sua formação, dois aa são removidos para a formação de um peptídeo de 8 aa, a angiotensina II (ANG II). Essa conversão ocorre no pulmão, e é catalisada pela enzima conversora de angiotensina, a ECA, que está presente na membrana do endotélio pulmonar.

A ANG II pode atuar em dois subtipos de receptores, AT1 (AT1) e AT2 (AT2) (Tsutsumi and Saavedra, 1991). Os efeitos clássicos da ANG II, tais como

vasoconstrição, secreção de aldosterona, secreção de vasopressina, reabsorção de sódio e água e facilitação simpática, são mediadas pelos receptores AT1 tanto na periferia como no sistema nervoso central (SNC), (McKinley et al., 1996, Kaschima and Unger, 2003, Menani et al., 2004), como demonstrado na Figura 1.



**Figura 1:** Sistema Renina-Angiotensina [adaptado de (Menani et al., 2004)]

Muitos estudos apontam inúmeros fatores que agem como facilitadores da hipertensão derivada da obesidade (Arnold et al., 2009, Aghamohammadzadeh and Heagerty, 2012, Fardin et al., 2012, Putnam et al., 2012, Hall et al., 2015). Dentre eles podemos destacar uma maior ativação do SRA, inclusive do SRA localizado nos adipócitos, uma vez que a secreção dos componentes do SRA tais como ECA, angiotensinogênio e renina pelos adipócitos encontram-se mais elevados durante a obesidade (Van Harmelen et al., 2000, Goossens et al., 2003, Grobe and Rahmouni, 2012).

Dados da literatura (Karlsson et al., 1998, Marcus et al., 2013) evidenciaram a existência de todos os RNAm e a expressão de algumas proteínas dos componentes do SRA em adipócitos do tecido branco. Especificamente, foi encontrado no tecido adiposo o gene de expressão de renina, que ainda expressa enzimas, catepsina D e G, que podem, respectivamente, produzir ANG I em ANG II através de rotas alternativas do SRA. Além disso, induzido pela dieta hiperlipídica, houve um aumento da expressão de receptores de renina no tecido adiposo que podem levar a um aumento da atividade do SRA local e superprodução de ANG II, a qual pode extravasar do tecido adiposo branco para a circulação e aumentar os níveis sistêmicos de ANG II (Nguyen, 2011, Marcus et al., 2013).

Ademais, embora o fígado seja o principal órgão na produção de angiotensinogênio, alguns estudos, sugerem que esta não é a única fonte do mesmo, sendo o tecido adiposo, um forte contribuinte para os níveis de angiotensinogênio plasmático (Grobe and Rahmouni, 2012). Estudos demonstraram que camundongos transgênicos que não expressavam angiotensinogênio apenas no tecido adiposo tiveram uma redução da concentração plasmática de angiotensinogênio se comparados com os seus controles, demonstrando assim, a contribuição da produção de angiotensinogênio local para o SRA circulante e estabelecendo uma correlação entre a massa adiposa corpórea e a pressão arterial (Grobe and Rahmouni, 2012, Yiannikouris et al., 2012).

O excesso no consumo de gordura pode levar ao aumento da gordura visceral e retroperitoneal levando a uma compressão do rim que causa uma mudança nas forças físicas intra-renais podendo contribuir para o aumento da

retenção tubular e retenção de sódio (Menani et al., 2004, Hall et al., 2014, Hall et al., 2015). Estudos têm demonstrado que o aumento da pressão intra-renal causada pela gordura em volta e dentro do rim pode ser um importante mecanismo pelo qual a obesidade causa hipertensão (Hall, 1994, Henegar et al., 2001, Hall et al., 2014). Em humanos obesos, o aumento da gordura retroperitoneal e do seio renal estão fortemente associados com a hipertensão (Chughtai et al., 2010, Chandra et al., 2014, Hall et al., 2015).

### **1.3 ANG II e o prosencéfalo**

Em animais hipertensos, a barreira hematoencefálica é prejudicada em áreas importantes do controle da pressão arterial, como por exemplo, o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), o bulbo rostroventrolateral (RVL) e o núcleo do trato solitário (NTS) (Biancardi et al., 2014). Ademais, a obesidade tem sido descrita causar prejuízo da barreira hematoencefálica em filhotes de mães obesas (Kim et al., 2016). Sendo assim, durante a obesidade, é possível que com maiores níveis de ANG II circulante, este peptídeo além de atuar em seus receptores nos vasos e nos rins, pode também atuar nessas áreas encefálicas e causar aumento da atividade simpática e pressão arterial e atenuação do barorreflexo, inclusive em áreas que poderão estar com a barreira hematoencefálica desprotegida devido à obesidade (Casto and Phillips, 1984, Michelini and Bonagamba, 1990, Colombari et al., 2010, Freiria-Oliveira et al., 2013). De fato, em camundongos knock-out para receptores AT1a no PVN, o aumento de pressão arterial durante a ingestão de dieta hiperlipídica é atenuada (de Kloet et al., 2013).

Ademais, no proscéfalo existem muitas estruturas livres de barreira hematoencefálica, entre eles o órgão vascular da lâmina terminal (OVLT) e órgão sub-fornical (OSF) (Johnson, 2007). Essas áreas livres de barreira hematoencefálica, possuem receptores do subtipo AT1 de ANG II, a qual ativando os mesmos, acionam mecanismos centrais que levam a um aumento na atividade simpática e da secreção de vasopressina (Dampney, 1994, McKinley et al., 1996, Guyenet, 2006).

Desta forma, a hipótese do presente projeto é de que a dieta hiperlipídica possa promover a ativação do SRA e o conseqüente aumento de ANG II circulante. A ANG II circulante pode atuar no SNC em áreas prosencefálicas livres de barreira hematoencefálica, como o OSF e OVLT, que são ricas em receptores AT1 ou mesmo em áreas como o PVN que podem estar com a barreira hematoencefálica prejudicada na situação de obesidade. O OSF e OVLT enviam projeções excitatórias ao PVN, que por sua vez ativa os neurônios do RVL, que é a principal área do SNC onde os neurônios pré-motores simpáticos estão localizados. Sendo assim, a ANG II atuando em receptores prosencefálicos pode ativar vias neurais que promovem aumento da atividade simpática e, portanto, da pressão arterial.

## **2. Objetivo Geral**

Verificar o efeito do bloqueio de receptores angiotensinérgicos do subtipo AT1 centrais sobre o aumento da pressão arterial em ratos alimentados com dieta hiperlipídica

### **2.1 Objetivos específicos**

- a. Verificar os efeitos de dieta hiperlipídica durante o período de 3 e 6 semanas sobre as variáveis cardiovasculares e metabólicas;
- b. Verificar a participação do sistema renina-angiotensina no prosencéfalo e sua correlação com a hipertensão em ratos obesos

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados ratos Holtzman adultos (300 a 320 g) procedentes do Biotério do Campus de Araraquara da UNESP. Todos os animais foram mantidos em caixas plásticas coletivas (três animais por caixa), com livre acesso a ração e água. Permaneceram em salas climatizadas (temperatura de  $23 \pm 2^\circ \text{C}$  e umidade de  $50 \pm 10\%$ ), com ciclo claro-escuro de doze horas (luzes acesas das 7 h às 19:00 h). Os protocolos propostos estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão Ética e Uso de Animais (CEUA, processo 20/2013)

#### **3.2 Dietas**

Duas dietas foram utilizadas na presente investigação, dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (DH). A dieta padrão composta por ração balanceada da marca Biobase (Águas Frias SC) contendo: 23 g de proteína, 49 g de carboidrato, 4 g de gordura, 5 g de fibras e 200 mg de sódio por 100 g de dieta, conforme fornecido pelo fabricante. A dieta hiperlipídica, foi preparada com ração Biobase, amendoim torrado, chocolate ao leite e biscoito de maisena, na proporção de 3:2:2:1 segundo descrito anteriormente (Estadella et al., 2004, Speretta et al., 2016). Esta dieta hiperlipídica contém 13 g de proteína, 19 g de gordura, 40 g de carboidrato, 4 g de fibra e 73 mg de sódio por 100 g de dieta, segundo exame bromatológico realizado com amostra da dieta. Todos os componentes desta dieta foram moídos, misturados e oferecidos aos animais em forma de pellets. O valor calórico das dietas foram aproximadamente: 2,25 kcal/g para a DP e 3,82 kcal/g para DH.

### **3.3 Implante de Cânula no ventrículo lateral**

Para as cirurgias cerebrais, os ratos foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg de peso corporal; Cristália, Itapira, SP, Brasil) e xilazina (7 mg/kg de peso corporal; Agener União, Embu-Guaçu, SP, Brasil) administradas intraperitonealmente e posicionados em um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900). O bregma e o lambda foram utilizados como referência para nivelar a cabeça dos animais e se determinar os pontos de introdução da cânula-guia de aço inoxidável no ventrículo lateral (VL), a saber: AP = 0.1 mm rostral ao bregma; L = 1.4 mm lateral ao bregma; V = 3.3 mm abaixo da superfície do osso. Após, encontrado os pontos de introdução da cânula. Nesse ponto foi feita trepanação do osso do crânio com uma broca esférica, abrindo-se um orifício de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro. A cânula-guia de aço inoxidável com diâmetro interno de 0,5 mm e comprimento de 12 mm mm. Ao fim da cirurgia cerebral, os ratos receberam uma injeção intramuscular de antibiótico (benzilpenicilina – 80.000 UIs/estreptomicina – 33 mg; Pentabiótico Veterinário – Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil) e uma injeção subcutânea de analgésico/anti-inflamatório (cetoprofeno 1% - 0,03 ml/rato; Ketoflex, Mundo Animal, São Paulo, SP, Brasil). Após a cirurgia, os ratos foram manipulados diariamente e os experimentos foram iniciados 5-7 dias após a cirurgia cerebral.

### **3.4 Injeção de Drogas no Ventrículo Lateral**

As injeções no ventrículo lateral foram feitas utilizando-se seringas Hamilton de 5 µl, conectada por um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora. Essa agulha injetora foi introduzida no VL pelas cânulas-guia previamente fixadas no encéfalo. A agulha injetora (0,3 mm d.i.) era 0,2 mm mais longa que a cânula-guia.

As microinjeções realizadas no VL são designadas a administração de drogas que tenham como local de ação áreas prosencefálicas.

### **3.5 Drogas Utilizadas**

Losartan (antagonista angiotensinérgico do subtipo AT1; 100 µg/1 µl; Dupont, USA), ANG II (50 ng/1 µl; Sigma, USA) foram diluídas em salina (NaCl 0,15 M), que foi utilizada como veículo.

### **3.6 Medidas da Pressão Arterial e Frequência Cardíaca**

No dia anterior ao registro da pressão arterial e frequência cardíaca, os animais foram anestesiados com cetamina + xilazina, conforme descrito anteriormente, e tubos de polietileno PE-10 soldados a tubos de polietileno PE-50 foram inseridos na aorta abdominal, através da artéria femoral para registro da pressão arterial (PA) e na veia cava inferior, através da veia femoral para injeções de drogas intravenosamente (iv). No dia seguinte, as cânulas, para registro de pressão arterial foram conectadas a um transdutor de pressão acoplado a um amplificador (ETH-200 CB SCIENCES INC) e a um sistema de aquisição e análise de dados (PowerLab, ADInstruments). Foram registrados simultaneamente a pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC). A PAM foi calculada a partir do sinal de PAP. A FC foi calculada como a frequência instantânea do sinal de PAP. Os registros foram feitos em animais acordados com livre movimentação.

### **3.7 Coleta de tecido adiposo e de encéfalo**

No final dos experimentos, azul de Evans a 1% (1  $\mu$ l) foi microinjetado no VL. Em seguida, os ratos foram profundamente anestesiados (tiopental sódico; 70 mg/kg de peso corporal; i.p.; Cristália, Itapira, SP, Brasil), o tecido adiposo (retroperitoneal, epididimal e mesentérico), foram imediatamente retirados. A seguir foi feita uma perfusão com solução de formalina 10%, os encéfalos foram retirados e cortes transversais (50  $\mu$ m) foram realizados com auxílio de um criostato (Leica, CM1850 UV, Wetzlar, Hesse, Germany). Os cortes foram montados em lâminas, corados pelo método Giemsa e analisados em microscópio óptico (Leica, DM5500 B, Wetzlar, Hesse, Germany) para a confirmação dos sítios de injeções.

### **3.8 Análises Estatísticas**

Os dados estão apresentados como média e o erro padrão da média (EPM). Análise de variância (ANOVA) de duas vias seguido teste de Student-Newman-Keuls ou teste *t* de Student foram utilizados para as comparações entre diferentes tratamentos e grupos, conforme o indicado. Diferenças foram consideradas significantes para  $p < 0,05$

## **4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS REALIZADOS**

### ***4.1 Dieta hiperlipídica e o bloqueio de receptores AT1 de Ang II no VL.***

Animais foram divididos em dois grupos: um grupo recebeu dieta padrão (DP) e outro recebeu dieta hiperlipídica (DH). Após 3 ou 6 semanas, os ratos receberam uma cânula de aço inoxidável no VL como descrito na metodologia (item 3.3) e após uma semana, um cateter foi implantado na artéria femoral para que no dia seguinte se iniciassem as medidas de PAM e FC como descrito no item 3.6. No dia do experimento, em ratos acordados e com livre movimentação, as medidas cardiovasculares foram realizadas durante um período basal (20 min antes das injeções no encéfalo). Dez min antes da microinjeção de losartan, foi realizada a microinjeção de salina (NaCl 0,15 M, no tempo -10 min), seguida da microinjeção de losartan (100 µg/1 µl; tempo 0). No final do registro das alterações cardiovasculares após o losartan (40 min), ANG II (50 ng/1 µl) foi microinjetada no VL para testar a eficácia do bloqueio de receptores angiotensérgicos do subtipo AT1.

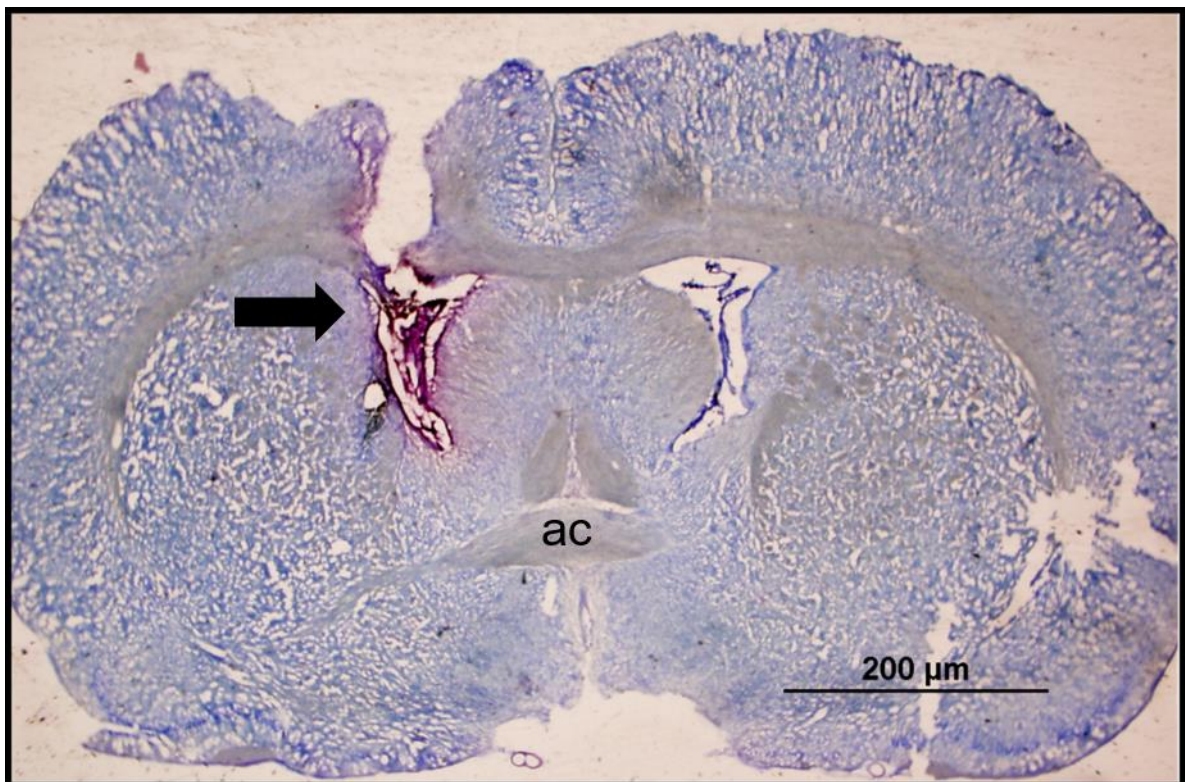
### ***4.2 Efeito da dieta hiperlipídica de 3 ou 6 semanas sobre parâmetros metabólicos.***

No final das medidas cardiovasculares, os animais foram anestesiados conforme o item 3.7, os tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e mesentérico de todos os animais foram retirados para posterior pesagem, e em seguida os animais tiveram sangue coletado para lipidograma, perfundidos e os encéfalos foram retirados

## 5. RESULTADOS

### 5.1 *Histologia*

A Figura 2 mostra o sítio de injeção no VL. Apenas animais com o posicionamento correto de cânulas no VL foram utilizados.



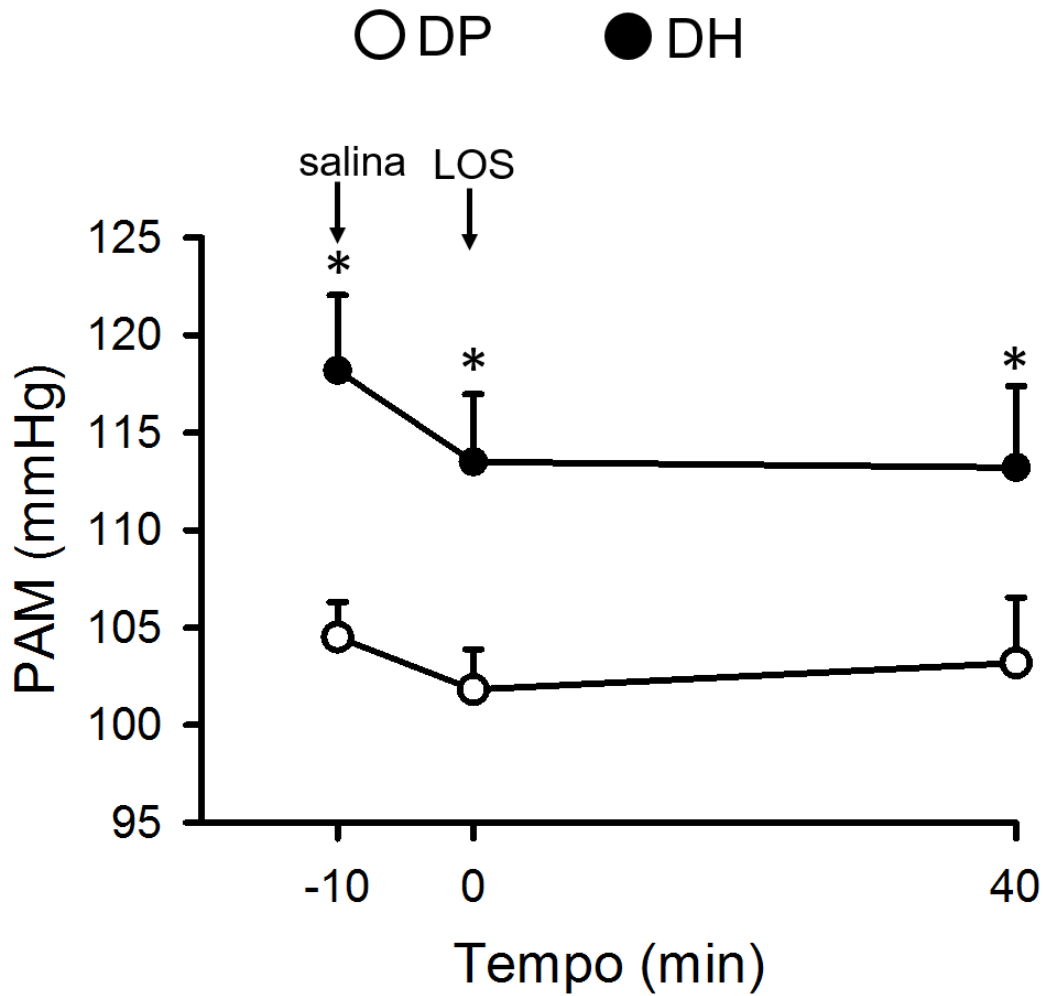
**Figura 2.** Fotomicrografia de um corte transversal do encéfalo de um rato representativo dos grupos testados mostrando o local da microinjeção, indicado pela seta, no ventrículo lateral (VL), (barra = 2,0 mm); ac = comissura anterior.

## **5.2 Efeito do bloqueio de receptores angiotensinérgicos do subtipo AT1 prosencéfalo sobre as alterações de PAM e FC e alterações metabólicas em ratos tratados com dieta hiperlipídica por 3 semanas.**

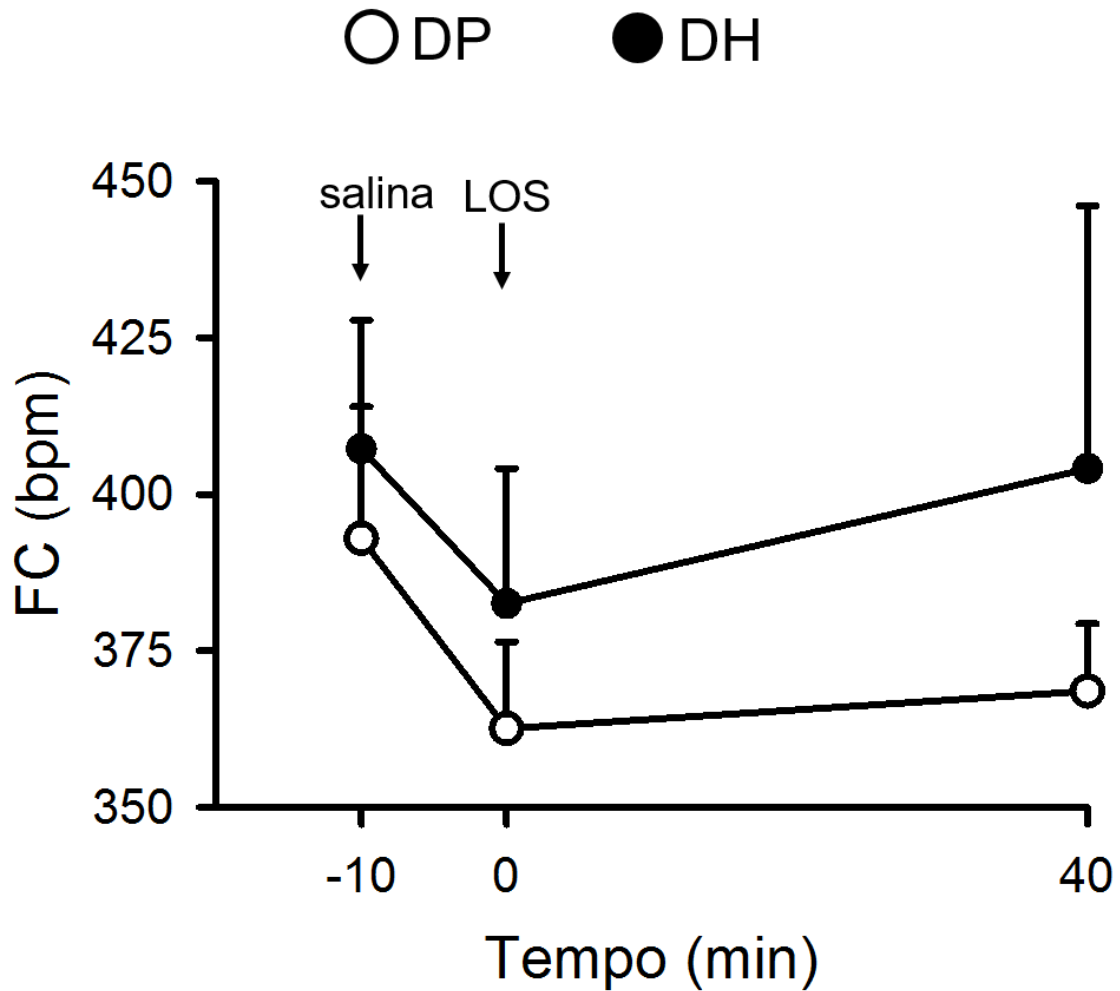
Foi observado que após 3 semanas de dieta hiperlipídica, os animais apresentaram uma PAM basal maior do que os ratos tratados com DP ( $118 \pm 4$  vs, DP:  $104 \pm 1$  mmHg;  $t = 10$  min),  $[F(1,27) = 21,133; P < 0,01]$ , Figura 3. Porém, embora ANOVA tenha encontrado diferença entre as dietas, não houve diferenças após o tratamento com losartan no VL ( $t = 40$  min), Figura 3. Salina no VL não promoveu qualquer alteração na PAM, Figura 3. Com relação a FC, não houve qualquer diferença entre os grupos experimentais  $[F(1,27) = 1,51; P > 0,05]$ , (Figura 4).

Podemos observar na Figura 5, que houve um aumento maior de peso no grupo tratado com DH comparado ao grupo DP, ao longo das 3 semanas de dieta  $[F(1,57) = 8,586; P < 0,05]$ . Observamos também um aumento na adiposidade dos animais DH comparado com os ratos DP, com aumentos significantes no tecido adiposo epididimal ( $t = -2,492; P < 0,05$ ); mesentérico ( $t = -2,559; P < 0,05$ ) e retroperitoneal ( $t = -3,100; P < 0,05$ ), Figura 6. Porém, com 3 semanas, embora houvesse uma tendência a um aumento no lipidograma, as diferenças foram significativas apenas no triglicérides ( $t = -2,556; P < 0,05$ ), Figura 7.

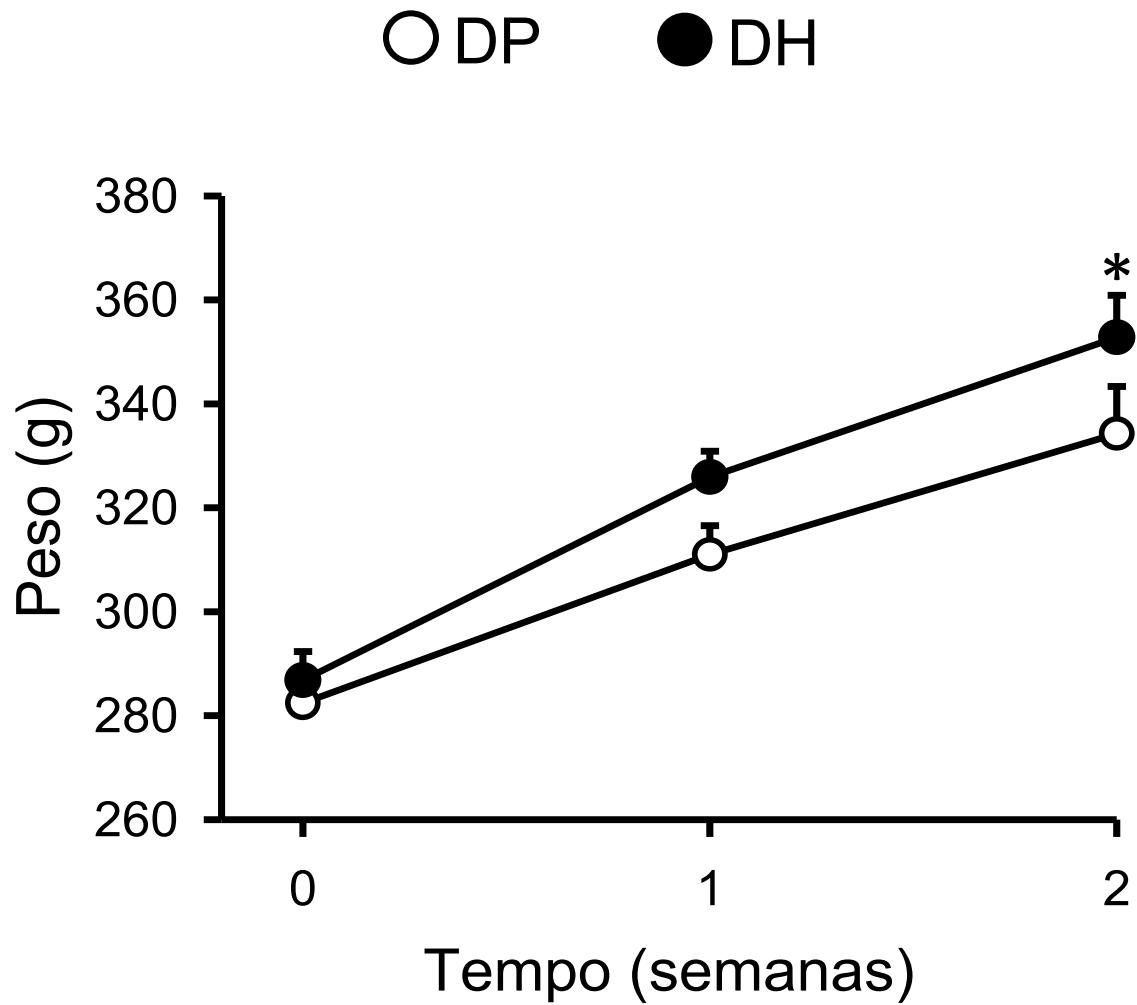
ANG II no VL não produziu aumentos significantes na PAM 40 min após o losartan nos dois grupos experimentais ( $4 \pm 3$  e  $2 \pm 2$  mmHg, respectivamente em ratos DP e DH).



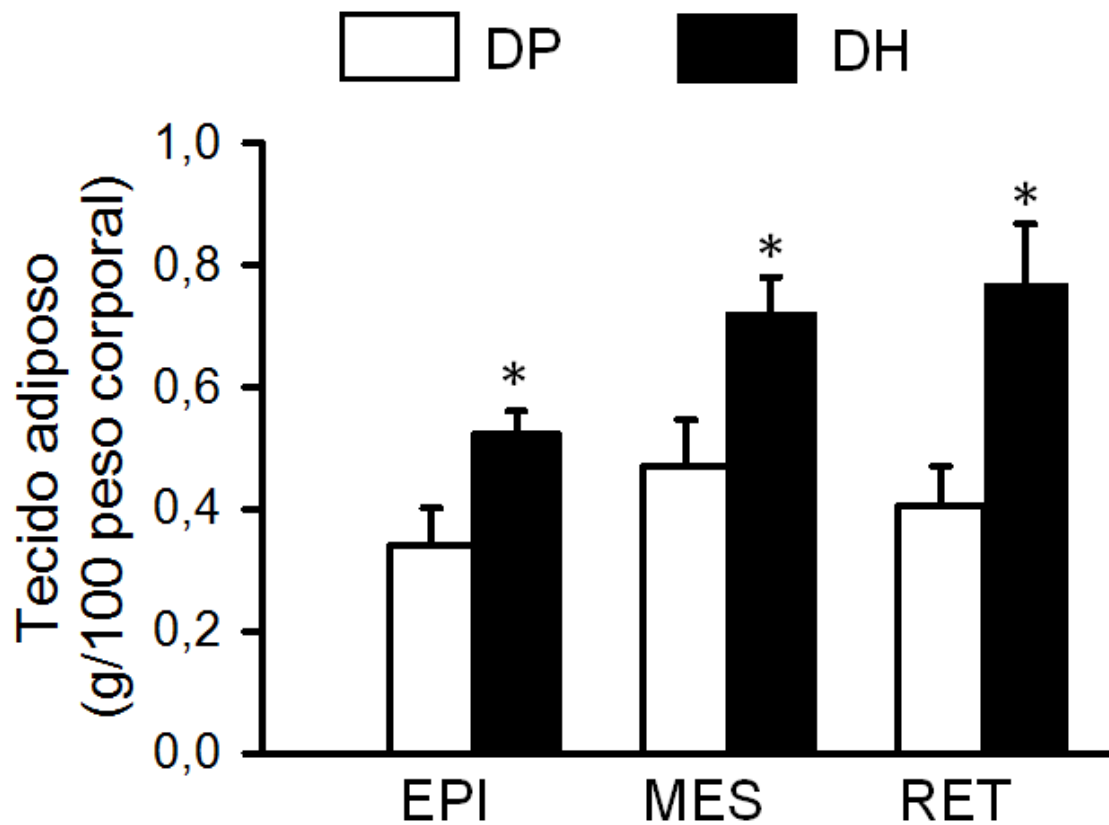
**Figura 3:** Alterações na pressão arterial média (PAM) em ratos tratados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 3 semanas que receberam losartan (100  $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$ ) no VL. Análise de variância de duas vias seguida do teste de Student-Newman-Keuls; \*  $p < 0,05$  vs. DP; DP = 6 e DH = 5.



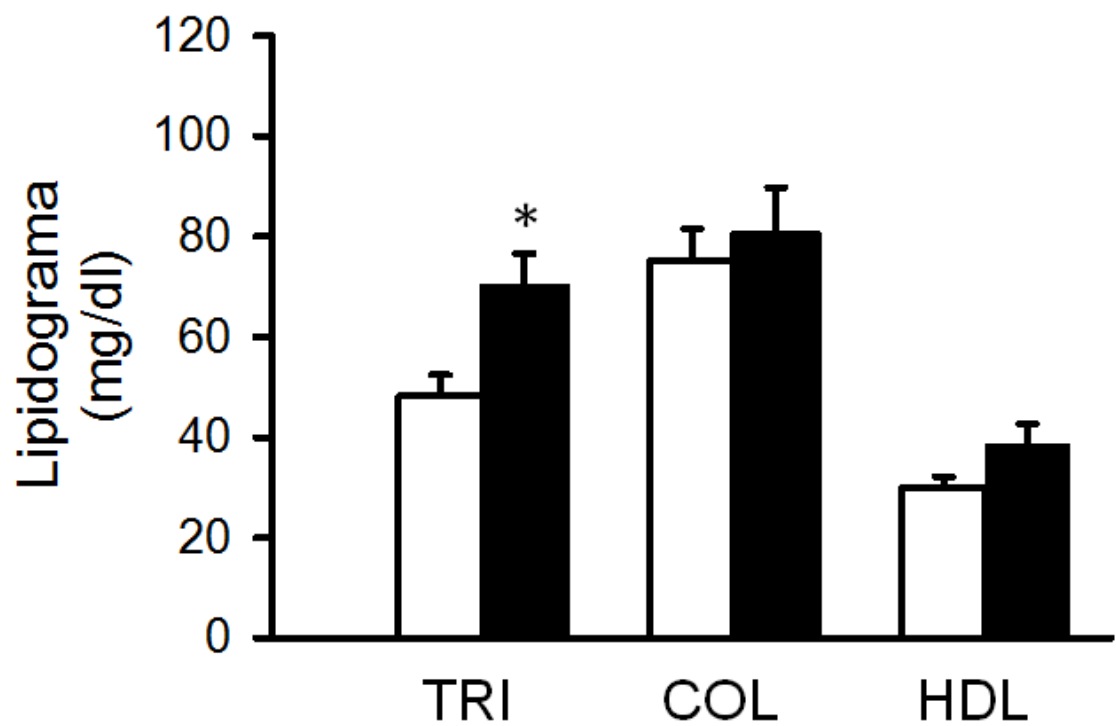
**Figura 4:** Alterações na frequência cardíaca (FC) em ratos tratados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 3 semanas que receberam losartan (100  $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$ ) no VL. Análise de variância de duas vias seguida do teste de Student-Newman-Keuls; DP = 6 e DH = 5.



**Figura 5:** Alterações no peso corporal em ratos tratados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 3 semanas. Análise de variância de duas vias seguida do teste de Student-Newman-Keuls; \*  $p < 0,05$  vs. DP; DP = 12 e DH = 10.



**Figura 6:** Tecido adiposo relativo ao peso corporal em ratos tratados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 3 semanas. Análise de variância por test t; \*  $p < 0,05$  vs. DP; DP = 8 e DH = 8. EPI = epididimal, MES= mesentérico, RET = retroperitoneal.

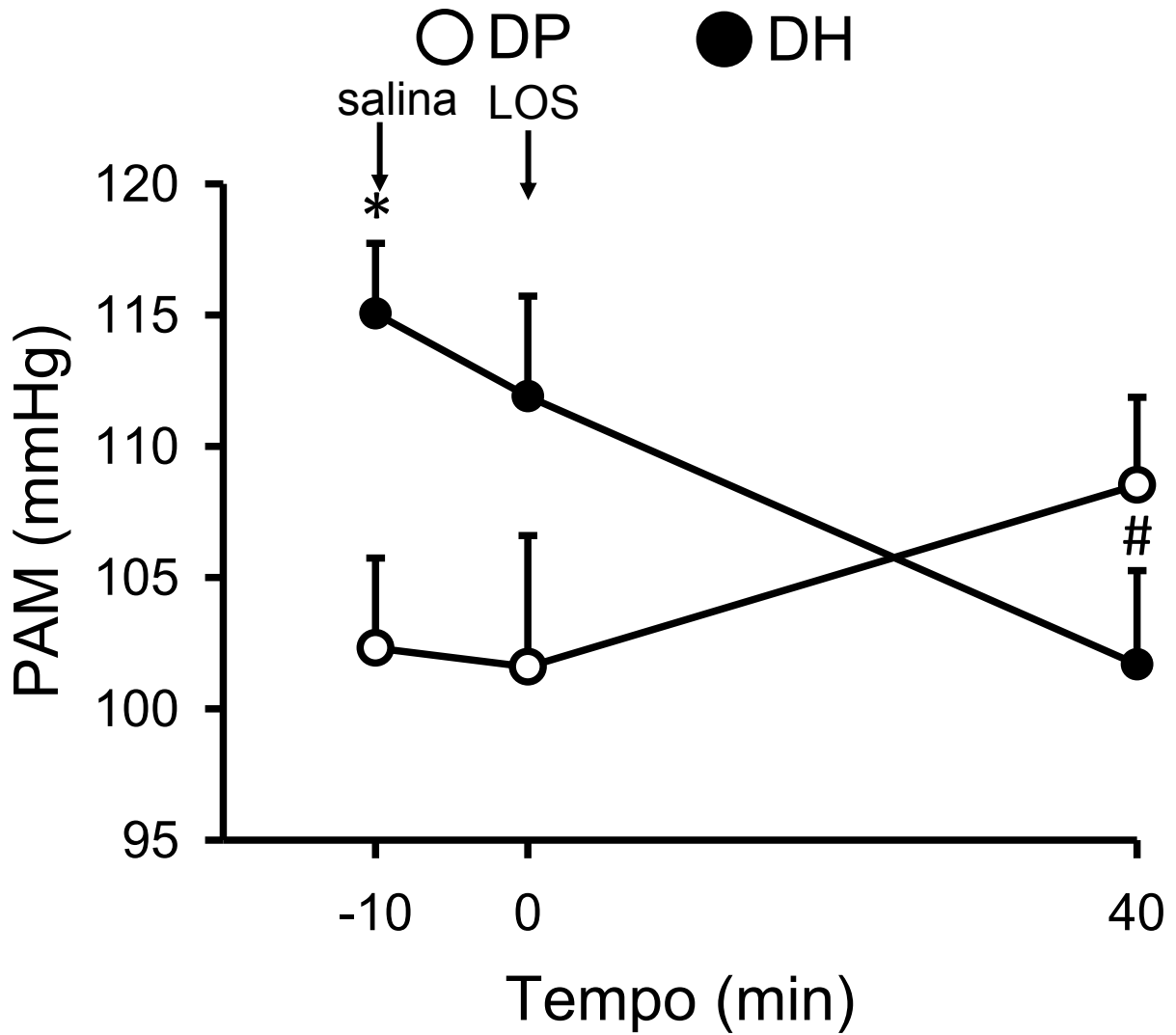


**Figura 7:** Lipidograma de ratos tratados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 3 semanas. Análise de variância por test t; \*  $p < 0,05$  vs. DP; DP = 6 e DH = 8. TRI = triglicérides, COL = colesterol total; HDL = lipoproteína de alta densidade

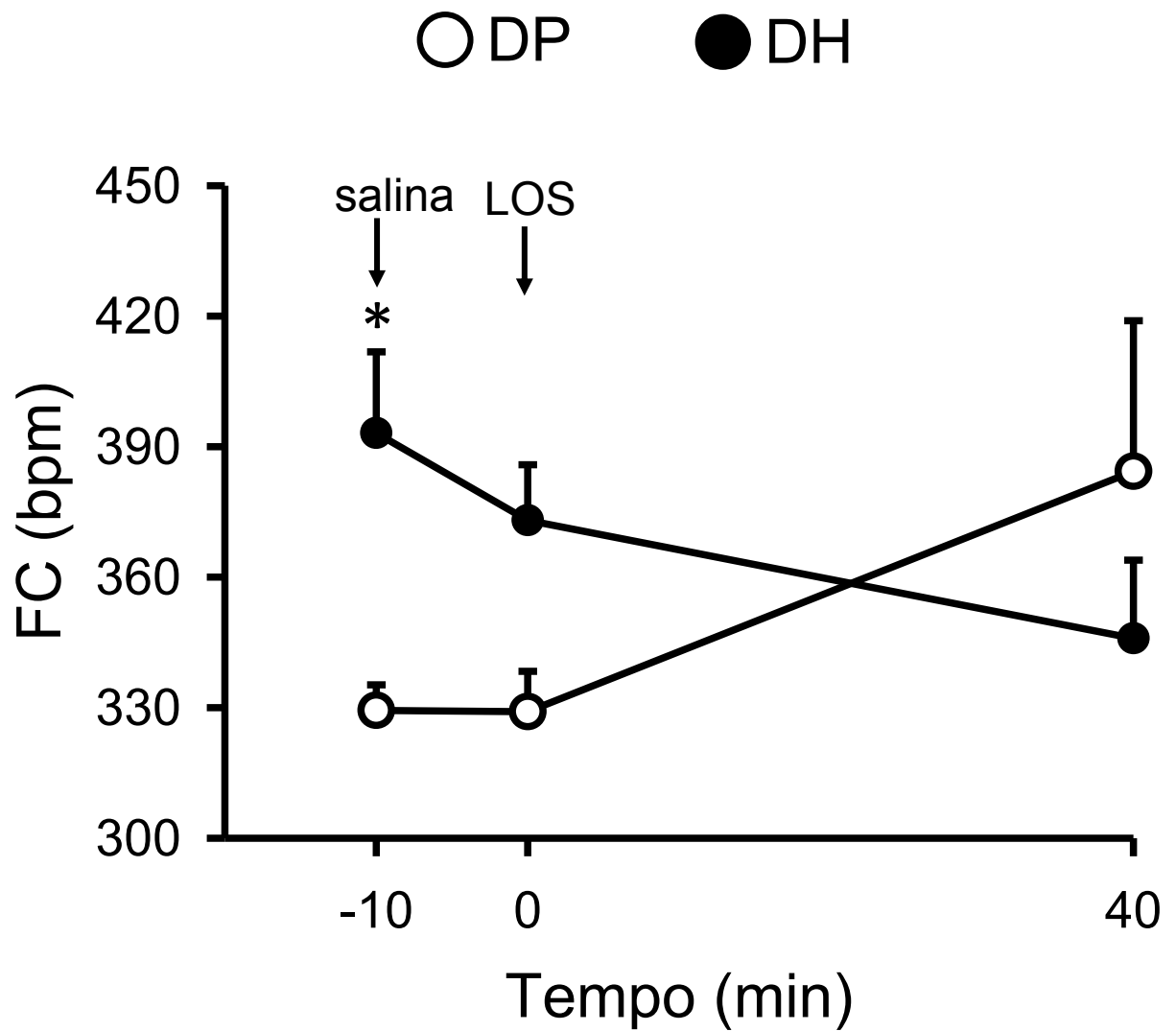
**5.3. Efeito do bloqueio de receptores angiotensinérgicos do subtipo AT1 no prosencéfalo sobre as alterações de PAM e FC e alterações metabólicas em ratos tratados com dieta hiperlipídica por 6 semanas.**

Foi observado que após 6 semanas de dieta hiperlipídica, os animais apresentaram uma PAM basal maior do que os ratos tratados com DP ( $115 \pm 3$  vs, DP:  $102 \pm 3$  mmHg;  $t = 10$  min), Figura 8. Houve interação entre os grupos, mostrando que o tratamento com losartan foi efetivo em reduzir a PAM apenas nos ratos DH [ $F(2,27) = 4,201$ ;  $P < 0,05$ ], Figura 8. Salina no VL não promoveu qualquer alteração significativa na PAM, Figura 8. Com relação a FC, observamos que os ratos DH tiveram uma FC basal maior do que dos ratos DP [ $F(2,27) = 4,203$   $P < 0,05$ ], porém o salina ou losartan não alteraram significativamente a FC inicial, Figura 9.

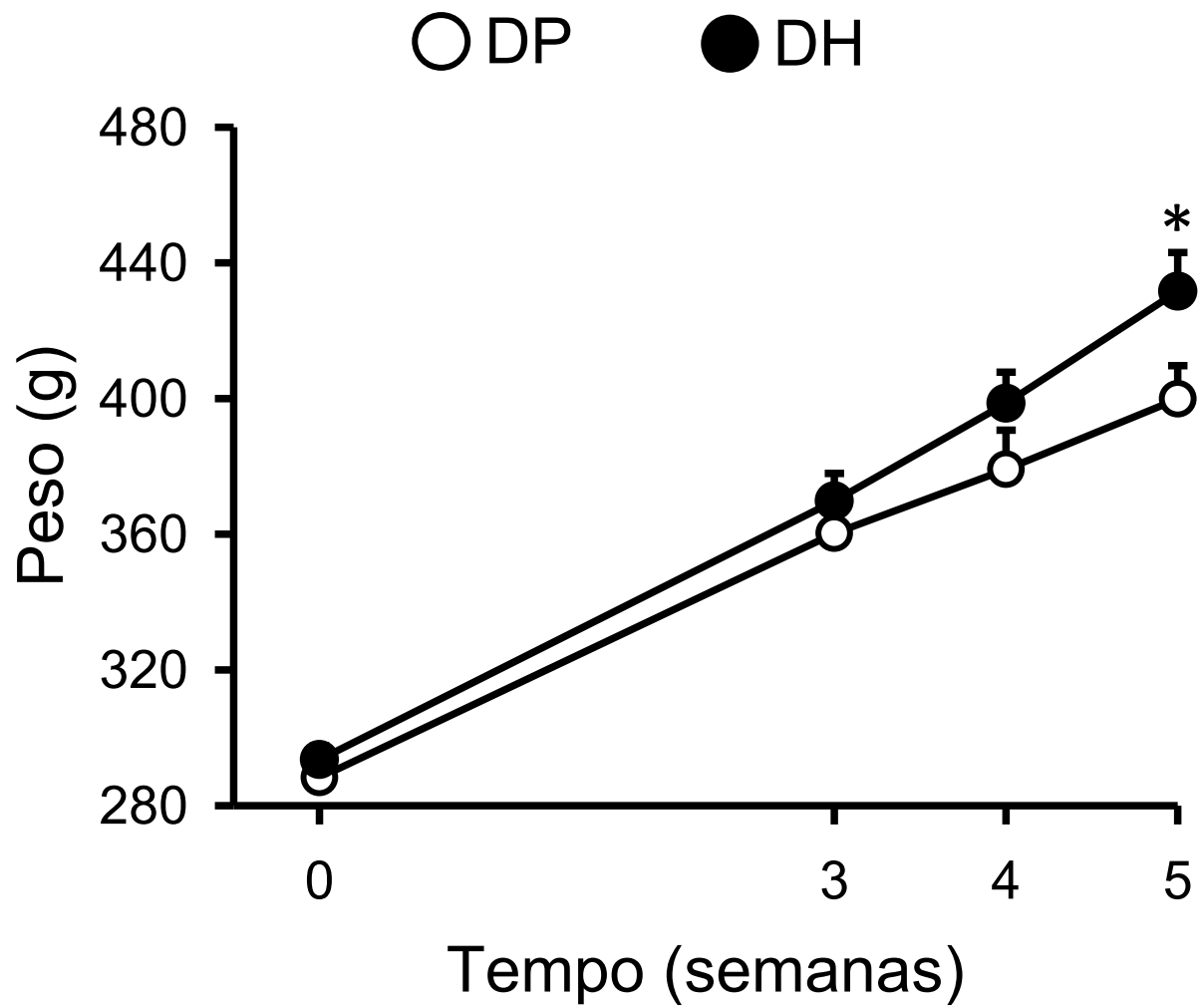
Podemos observar na Figura 10, que houve um aumento maior de peso no grupo tratado com DH comparado ao grupo DP [ $F(1,68) = 3,529$ ;  $P < 0,05$ ]. Observamos também um aumento na adiposidade dos animais DH comparado com os ratos DP, com aumentos no tecido adiposo epididimal ( $t = -3,731$ ;  $P < 0,05$ ); mesentérico ( $t = -3,748$ ;  $P < 0,05$ ) e retroperitoneal ( $t = -3,805$ ;  $P < 0,05$ ), Figura 11. Porém, com 6 semanas, embora houvesse uma tendência a um aumento no lipidograma, as diferenças foram significativas apenas no triglicérides ( $t = -2,673$ ;  $P < 0,05$ ), Figura 12.



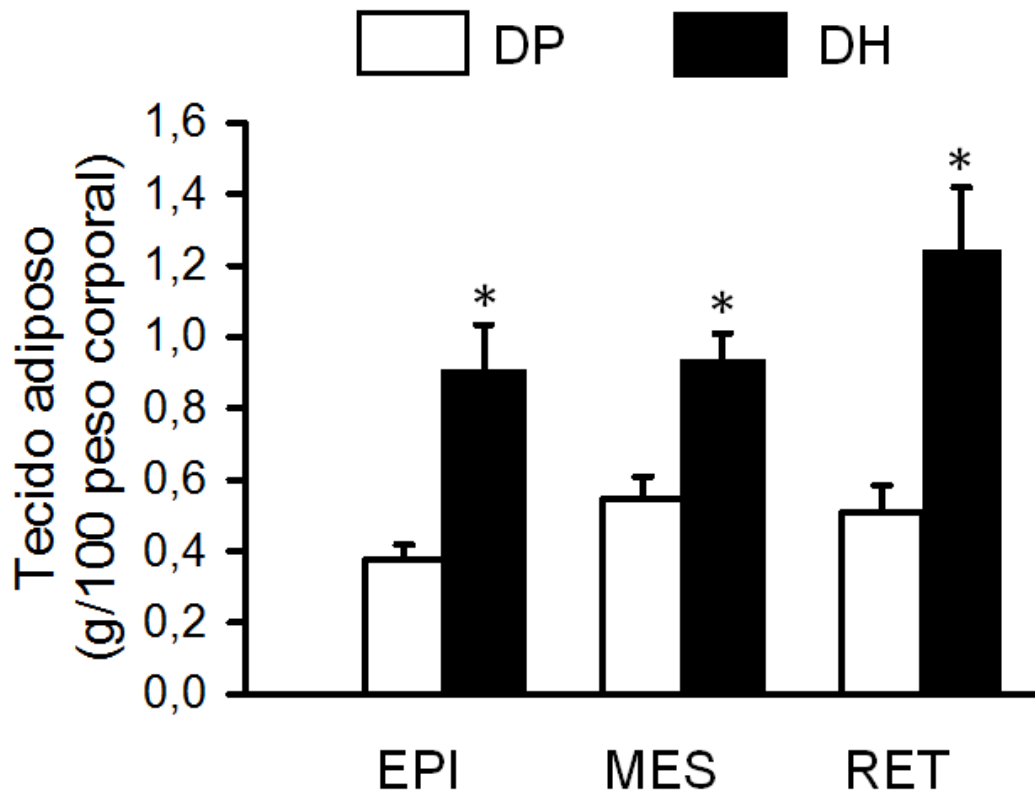
**Figura 8:** Alterações na pressão arterial média (PAM) em ratos tratados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas que receberam losartan (100  $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$ ) no VL. Análise de variância de duas vias seguida do teste de Student-Newman-Keuls; \*  $p < 0,05$  vs. DP; # diferente do tempo -10 do grupo DH. DP = 5 e DH = 6.



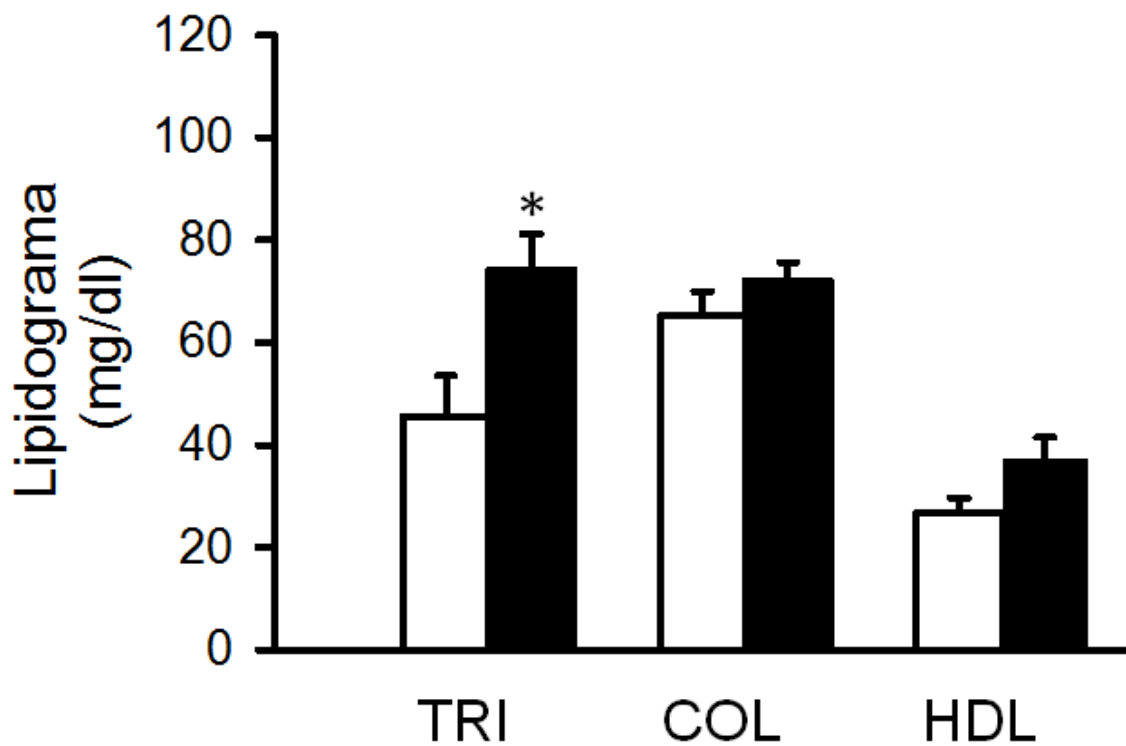
**Figura 9:** Alterações na frequência cardíaca (FC) em ratos tratados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas que receberam losartan (100  $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$ ) no VL. Análise de variância de duas vias seguida do teste de Student-Newman-Keuls; \*  $p < 0,05$  vs. DP; DP = 5 e DH = 6



**Figura 10:** Alterações no peso corporal em ratos tratados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas. Análise de variância de duas vias seguida do teste de Student-Newman-Keuls; \*  $p < 0,05$  vs. DP; DP = 9 e DH = 10



**Figura 11:** Tecido adiposo relativo ao peso corporal em ratos tratados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas. Análise de variância de duas vias seguida do teste de Student-Newman-Keuls; \*  $p < 0,05$  vs. DP; DP = 9 e DH = 9 para o tecido adiposo. EPI = epididimal, MES= mesentérico, RET = retroperitoneal.



**Figura 12:** Lipidograma de ratos tratados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por 6 semanas. Análise de variância por test t; \*  $p < 0,05$  vs. DP; DP = 8 e DH = 10. TRI = triglicérides, COL = colesterol total; HDL = lipoproteína de alta densidade

## 6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Tem sido descrito um aumento na pressão arterial, da atividade simpática e redução do barorreflexo em animais obesos (Stocker et al., 2007, Erdos et al., 2011, Guimaraes et al., 2014). Nossos dados demonstraram que com 3 semanas de DH, houve aumento significativo da PAM que perdura por até 6 semanas (grupo com maior tempo de tratamento com DH). Dessa forma, este modelo de dieta hiperlipídica estabelecido por Estadella *et al.* (Estadella et al., 2004) mostrou-se efetivo em aumentar a massa corporal, tecido adiposo e também a pressão arterial.

Dados ainda não publicados do nosso laboratório evidenciaram um maior nível de leptina em ratos tratados com DH a partir de 3 semanas. A leptina, um hormônio anorexígeno secretado pelos adipócitos, participa do controle do balanço energético controlando a ingestão alimentar. Estudos demonstraram que provavelmente pela alta sinalização de leptina no SNC em ratos obesos, ocorre uma saturação de transportadores de leptina levando a uma resistência a esse hormônio o que explica o desenvolvimento da obesidade mesmo com altos níveis de gordura (Burguera et al., 2000, Banks and Farrell, 2003). A microinjeção de leptina intracerebroventricular levou a um aumento da pressão arterial devido a seu efeito simpatoexcitatório que foi atenuada com o bloqueio do sistema melanocortina (Cassis et al., 2004). Além disso, o efeito de simpatoexcitação de leptina também foi reduzido com o bloqueio de receptores AT1 no prosencéfalo, mostrando assim uma interação entre o sistema melanocortina e o SRA (Hilzendeger et al., 2012) agindo conjuntamente no aumento da pressão arterial. Uma vez que os animais com 3 semanas de DH, não tiveram alteração da PAM com o pré-tratamento com losartan, antagonista de receptores AT1, no VL, é possível que a leptina, conforme descrito

acima, possa ser um dos mecanismos envolvidos com o aumento de PAM nesta fase. Porém, mais estudos serão necessários para elucidar esse mecanismo.

Por outro lado, em ratos tratados com DH por 6 semanas a microinjeção de losartan, no VL promoveu uma redução da pressão arterial em torno de ~10 mmHg. Vale ressaltar que a redução da PAM pelo bloqueio de receptores AT1 no prosencéfalo foi apenas em ratos DH. De fato, foi demonstrado que a DH aumenta o RNAm para receptores angiotensinérgicos do subtipo AT1 no hipotálamo (Erdos et al., 2011). Mais ainda, o bloqueio dos receptores AT1 periféricamente, reduz o aumento de pressão em ratos obesos (Boustany et al., 2005). Nesse contexto, é possível que os maiores níveis de ANG II circulante atuem em regiões do prosencéfalo livres ou não de barreira hematoencefálica, que podem estar com maior número de receptores angiotensinérgicos do subtipo AT1 sendo expressos. As regiões prosencefálicas, projetam-se direta ou indiretamente ao bulbo rostroventrolateral (RVL), onde estão localizados o principal grupamento de neurônios pré-motores simpáticos (Strack et al., 1989, Shafton et al., 1998) e dados da literatura mostram que o RVL está mais ativo em animais submetidos à dieta hiperlipídica (Stocker et al., 2007). Observamos também nos ratos DH com 6 semanas um aumento na FC basal. Após o tratamento com losartan, houve uma redução na FC em ratos DH, possivelmente decorrente de uma redução da atividade do sistema nervoso simpático.

Concluindo, nossos dados demonstram que os receptores angiotensinérgicos do subtipo AT1 prosencefálicos são importantes para o aumento de PAM observado em ratos submetidos à dieta hiperlipídica por 6 semanas. Os mecanismos envolvidos pelo aumento de PAM nos ratos submetidos à dieta hiperlipídica por 3 semanas ainda permanecem por esclarecer.

## 7. REFERÊNCIAS

- Aghamohammadzadeh R, Heagerty AM (2012) Obesity-related hypertension: epidemiology, pathophysiology, treatments, and the contribution of perivascular adipose tissue. *Ann Med* 44 Suppl 1:S74-84.
- Arnold AC, Shaltout HA, Gallagher PE, Diz DI (2009) Leptin impairs cardiovagal baroreflex function at the level of the solitary tract nucleus. *Hypertension* 54:1001-1008.
- Banks WA, Farrell CL (2003) Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity is acquired and reversible. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E10-15.
- Biancardi VC, Son SJ, Ahmadi S, Filosa JA, Stern JE (2014) Circulating angiotensin II gains access to the hypothalamus and brain stem during hypertension via breakdown of the blood-brain barrier. *Hypertension* 63:572-579.
- Boustany CM, Brown DR, Randall DC, Cassis LA (2005) AT1-receptor antagonism reverses the blood pressure elevation associated with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289:R181-186.
- Burguera B, Couce ME, Curran GL, Jensen MD, Lloyd RV, Cleary MP, Poduslo JF (2000) Obesity is associated with a decreased leptin transport across the blood-brain barrier in rats. *Diabetes* 49:1219-1223.
- Cassis LA, English VL, Bharadwaj K, Boustany CM (2004) Differential effects of local versus systemic angiotensin II in the regulation of leptin release from adipocytes. *Endocrinology* 145:169-174.
- Casto R, Phillips MI (1984) Mechanism of pressor effects by angiotensin in the nucleus tractus solitarius of rats. *Am J Physiol* 247:R575-581.

- Chandra A, Neeland IJ, Berry JD, Ayers CR, Rohatgi A, Das SR, Khera A, McGuire DK, de Lemos JA, Turer AT (2014) The relationship of body mass and fat distribution with incident hypertension: observations from the Dallas Heart Study. *J Am Coll Cardiol* 64:997-1002.
- Chughtai HL, Morgan TM, Rocco M, Stacey B, Brinkley TE, Ding J, Nicklas B, Hamilton C, Hundley WG (2010) Renal sinus fat and poor blood pressure control in middle-aged and elderly individuals at risk for cardiovascular events. *Hypertension* 56:901-906.
- Colombari E, Colombari DS, Li H, Shi P, Dong Y, Jiang N, Raizada MK, Sumners C, Murphy D, Paton JF (2010) Macrophage migration inhibitory factor in the paraventricular nucleus plays a major role in the sympathoexcitatory response to salt. *Hypertension* 56:956-963.
- Dampney RA (1994) Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev* 74:323-364.
- de Kloet AD, Pati D, Wang L, Hiller H, Sumners C, Frazier CJ, Seeley RJ, Herman JP, Woods SC, Krause EG (2013) Angiotensin type 1a receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus protect against diet-induced obesity. *J Neurosci* 33:4825-4833.
- Erdos B, Kirichenko N, Whidden M, Basgut B, Woods M, Cudykier I, Tawil R, Scarpace PJ, Tumer N (2011) Effect of age on high-fat diet-induced hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301:H164-172.
- Estadella D, Oyama LM, Damaso AR, Ribeiro EB, Oller Do Nascimento CM (2004) Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition* 20:218-224.

- Fardin NM, Oyama LM, Campos RR (2012) Changes in baroreflex control of renal sympathetic nerve activity in high-fat-fed rats as a predictor of hypertension. *Obesity (Silver Spring)* 20:1591-1597.
- Freiria-Oliveira AH, Blanch GT, Li H, Colombari E, Colombari DS, Sumners C (2013) Macrophage migration inhibitory factor in the nucleus of solitary tract decreases blood pressure in SHR. *Cardiovasc Res* 97:153-160.
- Goossens GH, Blaak EE, van Baak MA (2003) Possible involvement of the adipose tissue renin-angiotensin system in the pathophysiology of obesity and obesity-related disorders. *Obes Rev* 4:43-55.
- Grobe JL, Rahmouni K (2012) Editorial focus: A fat contribution to RAS activation and blood pressure control: evidence from angiotensinogen conditional null mice. Focus on: "Adipocyte-specific deficiency of angiotensinogen decreases plasma angiotensinogen concentration and systolic blood pressure in mice.". *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302:R242-243.
- Guimaraes PS, Huber DA, Campagnole-Santos MJ, Schreihof AM (2014) Development of attenuated baroreflexes in obese Zucker rats coincides with impaired activation of nucleus tractus solitarius. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 306:R681-692.
- Guyenet PG (2006) The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci* 7:335-346.
- Hall JE (1994) Louis K. Dahl Memorial Lecture. Renal and cardiovascular mechanisms of hypertension in obesity. *Hypertension* 23:381-394.
- Hall JE (2003) The kidney, hypertension, and obesity. *Hypertension* 41:625-633.

- Hall JE, do Carmo JM, da Silva AA, Wang Z, Hall ME (2015) Obesity-induced hypertension: interaction of neurohumoral and renal mechanisms. *Circ Res* 116:991-1006.
- Hall ME, do Carmo JM, da Silva AA, Juncos LA, Wang Z, Hall JE (2014) Obesity, hypertension, and chronic kidney disease. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 7:75-88.
- Henegar JR, Bigler SA, Henegar LK, Tyagi SC, Hall JE (2001) Functional and structural changes in the kidney in the early stages of obesity. *J Am Soc Nephrol* 12:1211-1217.
- Hilzendeger AM, Morgan DA, Brooks L, Dellsperger D, Liu X, Grobe JL, Rahmouni K, Sigmund CD, Mark AL (2012) A brain leptin-renin angiotensin system interaction in the regulation of sympathetic nerve activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 303:H197-206.
- Johnson AK (2007) The sensory psychobiology of thirst and salt appetite. *Med Sci Sports Exerc* 39:1388-1400.
- Karlsson C, Lindell K, Ottosson M, Sjostrom L, Carlsson B, Carlsson LM (1998) Human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensin II. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3925-3929.
- Kaschina E, Unger T (2003) Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press* 12:70-88.
- Kim DW, Glendining KA, Grattan DR, Jasoni CL (2016) Maternal Obesity in the Mouse Compromises the Blood-Brain Barrier in the Arcuate Nucleus of Offspring. *Endocrinology* 157:2229-2242.

- Marcus Y, Shefer G, Stern N (2013) Adipose tissue renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and progression of insulin resistance. *Mol Cell Endocrinol* 378:1-14.
- McKinley MJ, McAllen RM, Pennington GL, Smardencas A, Weisinger RS, Oldfield BJ (1996) Physiological actions of angiotensin II mediated by AT1 and AT2 receptors in the brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 3:S99-104.
- Menani JV, Silveira JEN, Colombari DSdA, Jr. LADL (2004) Mecanismo de controle da excreção de sódio. In: *Hipertensão*, vol. 7.
- Michelini LC, Bonagamba LG (1990) Angiotensin II as a modulator of baroreceptor reflexes in the brainstem of conscious rats. *Hypertension* 15:445-50.
- Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, Marks JS (2003) Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA* 289:76-79.
- Neto ANM, Simões MOdS, Medeiros ACDd, Portela AdS, Souza CMPd (2008) OBESIDADE, ENVELHECIMENTO E RISCO CARDIOVASCULAR NO BRASIL: POSSÍVEIS SOLUÇÕES PARA PROBLEMAS ATUAIS *Revista saude* 4:57-63.
- Nguyen G (2011) Renin and prorenin receptor in hypertension: what's new? *Curr Hypertens Rep* 13:79-85.
- Putnam K, Shoemaker R, Yiannikouris F, Cassis LA (2012) The renin-angiotensin system: a target of and contributor to dyslipidemias, altered glucose homeostasis, and hypertension of the metabolic syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302:H1219-1230.
- saúde Md (2015) Metade dos brasileiros está com excesso de peso. Portal Brasil.

- Shafton AD, Ryan A, Badoer E (1998) Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus send collaterals to the spinal cord and to the rostral ventrolateral medulla in the rat. *Brain Res* 801:239-243.
- Speretta GF, Silva AA, Vendramini RC, Zanesco A, Delbin MA, Menani JV, Bassi M, Colombari E, Colombari DS (2016) Resistance training prevents the cardiovascular changes caused by high-fat diet. *Life Sciences* 146:154-62
- Stocker SD, Meador R, Adams JM (2007) Neurons of the rostral ventrolateral medulla contribute to obesity-induced hypertension in rats. *Hypertension* 49:640-646.
- Strack AM, Sawyer WB, Platt KB, Loewy AD (1989) CNS cell groups regulating the sympathetic outflow to adrenal gland as revealed by transneuronal cell body labeling with pseudorabies virus. *Brain Res* 491:274-296.
- Tsutsumi K, Saavedra JM (1991) Quantitative autoradiography reveals different angiotensin II receptor subtypes in selected rat brain nuclei. *J Neurochem* 56:348-351.
- Van Harmelen V, Ariapart P, Hoffstedt J, Lundkvist I, Bringman S, Arner P (2000) Increased adipose angiotensinogen gene expression in human obesity. *Obes Res* 8:337-341.
- WHO (2016) Obesity and overweight. Disponível em : <<http://www.who.int/topics/obesity/en/>>. Acesso em: 20 de setembro de 2016
- Yiannikouris F, Karounos M, Charnigo R, English VL, Rateri DL, Daugherty A, Cassis LA (2012) Adipocyte-specific deficiency of angiotensinogen decreases plasma angiotensinogen concentration and systolic blood pressure in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302:R244-251.

Dados finais:

Araraquara, 12 de janeiro de 2017

---

Jéssica Matheus de Sá

De acordo,

---

Débora Simões de Almeida Colombari