



**Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina de Botucatu**

**INFLUÊNCIA DO BLOQUEIO DO RECEPTOR
AT1 SOBRE OS COLÁGENOS I E III
MIOCÁRDICO DE RATOS OBESOS POR
DIETA HIPERLIPÍDICA SATURADA**

Danielle Cristina Tomaz da Silva Bertani

**BOTUCATU
2016**

Danielle Cristina Tomaz da Silva-Bertani

INFLUÊNCIA DO BLOQUEIO DO RECEPTOR
AT1 SOBRE OS COLÁGENOS I E III
MIOCÁRDICO DE RATOS OBESOS POR
DIETA HIPERLIPÍDICA SATURADA

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de
Doutora em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Cicogna

**BOTUCATU
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Silva-Bertani, Danielle Cristina Tomaz da.

Influência do bloqueio do receptor AT1 sobre os colágenos I e III miocárdico de ratos obesos por dieta hiperlipídica saturada / Danielle Cristina Tomaz da Silva-Bertani. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Antonio Carlos Cicogna

Capes: 40101100

1. Obesidade. 2. Sistema renina-angiotensina. 3. Dieta hiperlipídica. 4. Colágeno. 5. Miocárdio. 6. Ratos Wistar.

Palavras-chave: Colágeno I e III miocárdico; Dieta hiperlipídica saturada; Obesidade; Rato; Sistema renina angiotensina.

*O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas;
é quem faz as verdadeiras perguntas.*

(Claude Lévi-Strauss)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida,

*Aos meus pais, **Luiz Marcos e Maria José**,
primeiros a lançarem as sementes do respeito e da
educação, sempre me ensinando os valores e os princípios
que conduzem a minha vida. O amor de vocês me
fortalece e me dá segurança para seguir em frente! Tudo
o que sou e conquisto, devo a vocês!*

*Ao meu marido, **Renato**, “...luz aos meus olhos e
chão aos meus pés...” pela nobreza de caráter,
sempre carinhoso, companheiro e compreensivo.
Te amo!*

*A minha irmã, **Aninha**, companheira e cúmplice, que
sempre está ao meu lado, me apoiando com muito amor e
carinho. Você é essencial na minha vida!*

*Aos meus queridos avós, **Luiz Romualdo** (in
memoriam) e **Júlia, Belmiro** (in memoriam) e
Josefa (in memoriam), sinônimos de amor,
dedicação e segurança.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Jesus, por me dar força interior para superar as dificuldades da vida, mostrando sempre os melhores caminhos a seguir nas horas incertas.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Cicogna, pela competência na orientação, respeito, dedicação, paciência, por acreditar na minha capacidade e pelos valiosos ensinamentos. O senhor foi fundamental no meu amadurecimento científico e pessoal.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani, pela disponibilidade e competência. Muito obrigada pela atenção e auxílio nos momentos necessários.

Aos queridos amigos Loreta, Dani, Paulinha Freire, Regiane, Fernanda, Maria Teresa, Paulinha Grippa e Dijon, sempre dispostos e prontos a ajudar no que é preciso. Vocês foram essenciais na finalização deste trabalho. Obrigada!

Aos companheiros do grupo “Cicogna”, Adriana, Scarlet, Carlos, Carol Adorni, Carol Mazeto, Cecília, Gustavo, Vitor, Sérgio, Damiana e Elenize, por dividirem comigo todas as alegrias e angústias, comemorando ou buscando soluções.

À amiga Camila Correa, pelas conversas agradáveis, apoio constante e pelos valiosos ensinamentos. Sua ajuda foi fundamental.

À Regina Moretto e Paulinha Doria, pela amizade, paciência e dedicação durante a realização das técnicas.

Aos amigos da Unidade de Pesquisa Experimental – (UNIPEX), Miriane, Igor, Aline, Camila Bonomo, Luana, Andrea, Bruna, Priscila, Camila Moreno, Marcelo e Ricardo. Obrigada pela amizade e pelos momentos de descontração vividos dia a dia.

Aos Professores Dr. Sílvia Assis de Oliveira-Junior e Dr. Robson Carvalho, pela atenção e sugestões prestadas na qualificação.

Aos Professores Dra. Edilamar Menezes de Oliveira e Dr. Tiago Fernandes pela enorme atenção e inúmeras contribuições científicas.

Aos amigos e funcionários da Unidade de Pesquisa Experimental – (UNIPEX), José Carlos Georgette, Elizete, Mário, Sueli Clara, Paulinho, Corina, Renata, Walderiana, Araldo, Regina Calsolari, Mara, Ângelo, Rogério, De Lalla, Diego, Eduardo, Esmite, Sueli e Tadeu pela agradável convivência, colaboração e amizade conquistada.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica, Ana Maria Mengue, Mario Augusto Dallaqua, Bruno José Fajiolli, Alexandre Luis Loureiro, Laura Andrade Câmara, Renato Borges Pereira, Elisângela Aparecida da Silva Pisan, por todos os auxílios prestados.

Aos funcionários da secretaria da Pós-graduação, Regina Célia Spadim, Andrea P. Longo Devidé, Diego C. Bovolim de Oliveira, Lílian C. Nadal Bianchi, Janete Ap. Herculano Nunes Sieva, Márcia Ferreira de Freitas Quadros, pela paciência e eficiência nas soluções de problemas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de Doutorado e por viabilizar a realização deste estudo. Muito obrigada! (Processo: 2012/21024-2)

A todos, que de forma direta ou indireta, colaboraram para a concretização deste trabalho. Muito obrigada!

*“Embora ninguém possa voltar atrás e
fazer um novo começo ...
qualquer um pode recomeçar agora e
fazer um novo fim !”*

(Chico Xavier)

Capítulo 1 – Introdução estendida

Introdução.....	11
Objetivo.....	16
Referências.....	17

Capítulo 2 – Artigo científico

Capa	25
Resumo	26
Abstract.....	28
Introdução	30
Material e Métodos	32
Resultados.....	38
Discussão	48
Conclusão.....	53
Referências	54

Capítulo 3 – Anexos

Anexo 1 – Perfil de ácidos graxos (%) das dietas normolipídica e hiperlipídica.....	66
---	----

Capítulo 1

Introdução estendida

A obesidade é uma doença metabólica crônica caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura em relação à massa magra tecidual⁽¹⁾. É considerada uma epidemia global, que atinge países desenvolvidos e subdesenvolvidos, afetando todos os grupos etários⁽¹⁻⁴⁾. É uma enfermidade que diminui a qualidade de vida, promove impacto social, custos elevados para o sistema de saúde, atenua ou impede as atividades do cotidiano, além de ser um dos principais fatores de risco para doenças crônicas e incapacitantes^(1,5,6-9).

A incidência e a prevalência da obesidade no mundo aumentaram significativamente nas últimas décadas, tendo quase que dobrado o número de indivíduos obesos entre 1980 a 2014, sendo que mais de 1,9 bilhões de pessoas, com idade superior a 18 anos, estavam acima do peso, e destas, mais de 600 milhões eram obesas⁽¹⁾. Estudo recente mostrou que mais de um terço dos adultos norte-americanos são portadores de obesidade⁽¹⁰⁾.

Essa alteração no perfil nutricional, em todo o mundo, também está ocorrendo no Brasil, onde há queda progressiva da desnutrição em favor de um aumento consistente da obesidade^(11,12). Pesquisa realizada entre 2008-2009 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)⁽¹³⁾ mostrou, na população acima de 20 anos, uma taxa de 49% e de 14,8% de sobrepeso e obesidade, respectivamente. A recente pesquisa da Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico (VIGITEL), do Ministério da Saúde, na população acima de 18 anos, mostrou 52,5% de sobrepeso e 17,9% de obesidade⁽¹⁴⁾. Estudos mostram que, provavelmente, no ano de 2025, 35% da população adulta brasileira será obesa, refletindo-se em redução na expectativa de vida e aumento do risco de mortalidade, representando um grave problema de saúde pública^(15,16).

O crescimento do número de indivíduos obesos é decorrente do desequilíbrio energético, resultante do aumento do sedentarismo somado à mudança nos hábitos alimentares, proveniente do excessivo consumo de calorias^(17,18) advindas de dietas ricas em açúcares e lipídios insaturados e/ou saturados^(17,19-21).

A obesidade caracteriza-se pela ampliação do tecido adiposo consequente ao aumento do tamanho das células, hipertrofia, e/ou do número de novos adipócitos procedentes das células progenitoras, hiperplasia⁽²²⁾. Esse tecido é constituído por pré-adipócitos, adipócitos, matriz intersticial, vasos sanguíneos, tecido nervoso, nódulos linfáticos, células do sistema imunológico e fibroblastos. Existem dois tipos: o branco e o marrom, sendo este último, pouco abundante e relacionado com produção de calor; o branco atua como isolante térmico, preenche e posiciona os órgãos, modela a superfície corporal e absorve impactos^(23,24); entretanto, sua função principal é armazenar ácidos graxos, na forma de triacilglicerol, para posterior utilização como substrato energético, na forma de adenosina trifosfato (ATP), de acordo com as demandas metabólicas periféricas. Essa mobilização, lipogênese e lipólise, recebe influência de diversas substâncias como, insulina, cortisol, catecolaminas, glucagon e hormônios tireoidiano e de crescimento. É também considerado um importante órgão endócrino, parácrino e autócrino capaz de secretar uma variedade de substâncias biologicamente ativas, denominadas adipocinas, as quais apresentam múltiplas funções, atuando em diferentes tecidos e órgãos, incluindo sangue, músculo esquelético, vaso, cérebro, fígado, rim, pâncreas e coração⁽²⁵⁻²⁷⁾. Ultimamente, foram identificadas mais de 600 adipocinas, como por exemplo, leptina, adiponectina, resistina, citocinas pró e anti-inflamatórias (adipocitocinas), fatores de crescimento, cortisol, esteroides e membros do sistema renina angiotensina⁽²⁶⁻³⁴⁾.

As adipocinas são produzidas pelos adipócitos e pelas células da matriz extracelular; a sua quantidade e o seu tipo são dependentes da localização e da magnitude do tecido adiposo⁽³⁴⁾. Enquanto a gordura visceral está associada à maior produção de fator de crescimento endotelial vascular, inibidor-1 do ativador do plasminogênio e citocinas pró-inflamatórias, o tecido subcutâneo secreta maior quantidade de leptina e adiponectina^(34,35). A

quantidade do tecido adiposo é também um fator primordial, existindo uma associação direta entre a sua extensão e produção das adipocinas⁽³⁴⁾.

Embora o aumento da massa adiposa possa ter efeito protetor, a elevação excessiva desse tecido, pode acarretar disfunção desse órgão, caracterizada pela hipertrofia dos adipócitos, diminuição da capacidade de estoque de triacilglicerol e desregulação da secreção de adipocinas como, diminuição da produção de adiponectina e aumento da secreção, por exemplo, do sistema renina angiotensina (SRA)⁽³⁴⁾.

O SRA é considerado um eixo endócrino, com importante participação na hemostasia do sistema cardiovascular⁽³⁶⁻⁴¹⁾. A cascata, do ponto de vista clássico, inicia-se com a enzima renina, produzida no aparelho justa glomerular renal, que metaboliza angiotensinogênio em angiotensina I, que é convertida em angiotensina-II pela enzima conversora de angiotensina (ECA)^(36-38,40,41). A angiotensina-II é considerada o principal componente biologicamente ativo do SRA, possuindo importante papel na regulação da pressão arterial, no volume plasmático, no crescimento celular e na atividade nervosa simpática⁽⁴²⁾.

A maioria dos efeitos cardiovasculares da angiotensina-II é desencadeada pela sua ligação a receptores específicos, denominados AT1 e AT2^(38,43,44). A estimulação dos receptores AT1, amplamente distribuídos no organismo (vasos, rins, fígado, cérebro e coração) resulta, por exemplo, em vasoconstrição, aumento da contratilidade miocárdica, da hipertrofia das células cardíacas e hiperplasia dos fibroblastos^(36,40). Entretanto, os receptores AT2 exercem efeitos opostos aos AT1; sua ativação ocorre durante circunstâncias patológicas, como o infarto do miocárdio e a insuficiência cardíaca, apresentando efeitos benéficos ao promover vasodilatação, anti-proliferação e melhoria da função cardíaca^(36,40,43).

O SRA não é apenas um sistema hormonal sistêmico, há muitas evidências que todos os seus componentes são sintetizados *in situ* no coração, não sendo originariamente captados da circulação^(36,44-48). Danser e Schalekamp⁽⁴⁹⁾ mostraram que o tecido cardíaco pode sintetizar

a angiotensina-I e converte-la em angiotensina-II, podendo atingir concentrações até três vezes maiores do que as encontradas no plasma. Estudos indicam que, enquanto o SRA circulante exerce um efeito predominantemente agudo e hemodinâmico, o sistema tecidual miocárdico está envolvido em efeitos de longa duração, como remodelação cardíaca⁽⁴⁶⁾, caracterizada, entre outros, pela alteração da matriz intersticial.

A matriz extracelular tem como principal componente o colágeno, tendo sido identificado, até o momento, mais de 20 tipos, sendo os mais estudados, os tipos I, II, III, IV e V⁽⁵⁰⁻⁵²⁾. No miocárdio há o predomínio dos tipos I e III, sendo que, dependendo da espécie, representam cerca de 80% e 10% do colágeno total de um coração saudável, respectivamente^(53,54). O principal papel do colágeno no coração é contribuir para a manutenção da arquitetura e função cardíaca^(53,55).

A quantidade de colágeno depende do equilíbrio entre a produção e a degradação. A síntese, que ocorre através dos fibroblastos, envolve eventos intra e extracelulares; inicia-se com formação de uma molécula de pró-colágeno, que ao penetrar no retículo endoplasmático sofre diferentes processos bioquímicos, que resultam em uma molécula helicoidal de três fitas, denominadas de pró-colágeno, que serão, posteriormente, secretadas para o meio extracelular; neste local, o pró-colágeno se converte em moléculas de colágeno, as quais se reúnem para formar uma fibrila. A agregação dessas fibrilas, através de ligações covalentes cruzadas, inter e intramolecular, origina uma fibra de colágeno^(53,56-58). Além de sintetizar essa proteína, os fibroblastos, entre outros tipos de células⁽⁵³⁾, também produzem as metaloproteinases de matriz (MMPs), grupo de endopeptidases responsáveis pela degradação, principalmente, dos colágenos; a ativação das MMPs depende da sua ligação com cálcio ou zinco. Até o momento, foram identificadas 25 tipos diferentes de MMPs⁽⁵⁹⁾, e destas, o subconjunto de collagenases e de gelatinases estão presentes no miocárdio, sendo as MMP-1, MMP-2 e MMP-9 as mais relacionadas as doenças cardíacas^(53,60-63). A degradação dos

componentes da matriz pelas MMPs é regulada por vários fatores como, citocinas, hormônios, fatores de crescimento, estresse oxidativo; esse processo pode ser feito em três níveis: transcrição gênica, modificação pós-traducional e interação das MMPs com seus inibidores teciduais endógenos, os TIMPs^(53,56,64). Há quatro membros da família TIMP: 1, 2, 3 e 4, dos quais o TIMP-1 e TIMP-2 são os mais caracterizados e estudados em diferentes órgãos, inclusive no miocárdio⁽⁶⁵⁾.

Embora exista uma extensa literatura analisando o metabolismo do colágeno miocárdico e angiotensina II⁽⁶⁶⁻⁷⁰⁾ e, também, o comportamento dos colágenos I e/ou III em diferentes tecidos e protocolos experimentais de obesidade⁽⁷¹⁻⁸⁰⁾, não encontramos dados relacionando colágenos I e III miocárdico, angiotensina II e obesidade por dieta hiperlipídica saturada. Em razão desta constatação e da associação deletéria entre ácidos graxos saturados e sistema cardiovascular⁽⁸¹⁻⁹⁰⁾, é importante analisar a relação da obesidade por dieta hiperlipídica saturada, colágenos I e III cardíaco e angiotensina II. Essa informação poderá contribuir para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na remodelação cardíaca e prevenção da deterioração da função miocárdica na condição de obesidade.

OBJETIVO

Esse trabalho testa a hipótese que a obesidade por dieta hiperlipídica saturada, aumenta os colágenos I e III cardíaco via ativação do receptor AT1 do SRA oriundo do excesso de tecido adiposo. Essa afirmação baseia-se no fato que a obesidade promove elevação do SRA circulante^(26,27,30,32-34,38,91), que ao atingir o coração, via receptores AT1, induz o aumento dos colágenos I e III. Para consolidar este preceito, foi realizado o bloqueio do receptor AT1 pela administração do fármaco Losartan.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Obesity and overweight. Access: 18/02/2016. Available from: <http://www.who.int>
2. Eckel RH, Barouch WW, Ershow AG. Report of the national heart, lung, and blood institute-national of diabetes and digestive and kidney diseases working group on the pathophysiology of obesity-associated cardiovascular disease. *Circulation*. 2002;105(24):2923-8.
3. O' Brien PE, Dixon JB. The extent of the problem of obesity. *Am J Surg*. 2002;184(6B):4S-8S.
4. Wong CY, O' Moore-Sullivan T, Leano R, Byrne N, Beller E, Marwick TH. Alterations of left ventricular myocardial characteristics associated with obesity. *Circulation*. 2004;110(19):3081-7.
5. Fontaine KR, Redden DT, Wang C, Westfall AO, Allison DB. Years of Life lost due to obesity. *JAMA*. 2003;289(2):187-93.
6. Wilson PWF, D' Agostino RB, Sullivan L, Parise H, Kannel WB. Overweight and Obesity as determinants of Cardiovascular risk. *Arch Intern Med*. 2002;162(16):1867-72.
7. Malnick SDH, Knobler H. The medical complications of obesity. *Q J Med*. 2006;99(9):565-79.
8. Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer X, et al. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Circulation*. 2006;113(6):898-18.
9. Lavie CJ, Milani RV, Ventura HO. Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53(21):1925-32.
10. Rizer AM, Mauery DR, Haynes SG, Couser B, Gruman C. Challenges in intervention research for lesbian and bisexual women. *LGBT Health*. 2015;2(2):105-12.
11. Monteiro CA, Mondini L, de Souza AL, Popkin BM. Da desnutrição para a obesidade: a transição nutricional no Brasil. In: Monteiro CA. Velhos e novos males da saúde no Brasil: a evolução do país e de suas doenças. São Paulo: Hucitec-NUPENS/USP. 1995;247-55.
12. Monteiro CA, Mondini L, de Souza AL, Popkin BM. The nutrition transition in Brazil. *Eur J Clin Nutr*. 1995;49(2):105-13.
13. Brasil. Ministério do Planejamento. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Rio de Janeiro; 2010.

14. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigitel Brasil 2013: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde; 2014.
15. Blaak EE, Wagenmakers AJ, Glatz JF, Wolffenbuttel BH, Kemerink GJ, Langenberg CJ, et al. Plasma FFA utilization and fatty acid-binding protein content are diminished in type 2 diabetic muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;279(1):E146-54.
16. Ferrario CM, Brosnihan KB, Chappell M. Measurements of angiotensin peptides. *Hypertension*. 1995;26(5):843-5.
17. Pereira-Lancha LO, Campos-Ferraz PL, Lancha AH. Obesity: considerations about etiology, metabolism, and the use of experimental models. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2012;5(1):75–87.
18. Sowers JR, Whaley-Connell A, Hayden MR. The role of overweight and obesity in the cardiorenal syndrome. *Cardiorenal Med*. 2011;1(1):5–12.
19. Roberts SB, McCrory MA, Saltzman E. The influence of dietary composition on energy intake and body weight. *J Am Coll Nutr*. 2002;21(2):140S-5S.
20. Lottenberg AM, Afonso MS, Lavrador MSF, Machado RM, Nakandakare ER. The role of dietary fatty acids in the pathology of metabolic syndrome. *J Nutr Biochem*. 2012;23(9):1027-40.
21. Van Dam RM, Seidell JC. Carbohydrate intake and obesity. *Eur J Clin Nutr*. 2007;61(1):S75-99.
22. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell*. 2014;156(1-2):20-44.
23. Saely CH, Geiger K, Drexel H. Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology*. 2012;58(1):15-23.
24. Zhang Y, Goldman S, Baerga R, Zhao Y, Komatsu M, Jin S. Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (atg7) in mice reveals a role in adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(47):19860-5.
25. Wankhade UD, Shen M, Kolhe R, Fulzele S. Advances in adipose- derived stem cells isolation, Characterization, and Application in Regenerative Tissue Engineering. *Stem Cells Int*. 2016. *[Epub ahead of print]*
26. Booth A, Magnuson A, Fouts J, Foster MT. Adipose tissue: an endocrine organ playing a role in metabolic regulation. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2016. *[Epub ahead of print]*
27. Lehr S, Hartwig S, Sell H. Adipokines: a treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *Proteomics Clin Appl*. 2012;6(1-2):91-01.

28. Matsuzawa Y. Adiponectin: a key player in obesity related disorders. *Curr Pharm Des.* 2010;16(17):1896-901.
29. Hall ME, Harmancey R, Stec DE. Lean heart: Role of leptin in cardiac hypertrophy and metabolism. *World J Cardiol.* 2015;7(9):511-24.
30. Govindarajan G, Alpert M, Tejwani L. Endocrine and metabolic effects of fat: Cardiovascular implications. *Am J Med.* 2008;121(5):366-70.
31. Mohan SK, Veeraraghavan VP, Jainu M. Effect of pioglitazone, quercetin and hydroxy citric acid on extracellular matrix components in experimentally induced non-alcoholic steatohepatitis. *Iran J Basic Med Sci.* 2015;18(8):832-6.
32. Segura J, Ruilope LM. Obesity, essential hypertension and renin-angiotensin system. *Public Health Nutr.* 2007;10(10A):1151-5.
33. Engeli S, Schling P, Gorzelniak K, Boschmann M, Janke J, Ailhaud G, et al. The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(6):807-25.
34. Klöting N, Blüher M. Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord.* 2014;15(4):277-87.
35. Müller MJ, Lagerpusch M, Enderle J, Schautz B, Heller M, Bosy-Westphal A. Beyond the body mass index: tracking body composition in the pathogenesis of obesity and the metabolic syndrome. *Obes Rev.* 2012;13(2):6-13.
36. Ahmadian E, Jafari S, Yari KA. Role of angiotensin II in stem cell therapy of cardiac disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2015;16(4):702-11.
37. Feng YH, Fu P. Dual blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system in type 2 diabetic kidney disease. *Chin Med J (Engl).* 2016;129(1):81-7.
38. Barretti DL, Magalhães FC, Fernandes T, do Carmo EC, Rosa KT, Irigoyen MC, et al. Effects of aerobic exercise training on cardiac renin-angiotensin system in an obese Zucker rat strain. *PLoS One.* 2012;7(10):e46114.
39. Smith PM, Hindmarch CC, Murphy D, Ferguson AV. AT1 receptor blockade alters nutritional and biometric development in obesity-resistant and obesity-prone rats submitted to a high fat diet. *Front Psychol.* 2014;29(5):832.
40. Giestas A, Palma I, Ramos MH. Renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and its pharmacologic modulation. *Acta Med Port.* 2010;23(4):677-88.
41. Thethi T, Kamiyama M, Kobori H. The link between the renin-angiotensin-aldosterone system and renal injury in obesity and the metabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep.* 2012;14(2):160-9.
42. Levy BI. How to explain the differences between renin angiotensin system modulators. *Am J Hypertens.* 2005;18(9 Pt 2):134S-41S.

43. Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med.* 2008;264(3):224-36.
44. Varagic J, Frohlich ED. Local cardiac renin-angiotensin system: hypertension and cardiac failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34(11):1435-42.
45. Kumar R, Singh VP, Baker KM. The intracellular renin-angiotensin system in the heart. *Curr Hypertens Rep.* 2009;11(2):104-10.
46. Kumar R, Baker KM, Pan J. Activation of the renin-angiotensin system in heart failure. In: Mann DL. *Heart failure: a companion to Braunwald's heart disease.* 2nd ed. Sant Louis: Elsevier. 2011;134-51.
47. Goossens GH, Jocken JW, Blaak EE, Schiffrers PM, Saris WH, van Baak MA. Endocrine role of the renin-angiotensin system in human adipose tissue and muscle: effect of beta-adrenergic stimulation. *Hypertension.* 2007;49(3):542-7.
48. Komuro I. Molecular mechanism of cardiac hypertrophy and development. *Jpn Circ J.* 2001;65(5):353-8.
49. Danser AH, Schalekamp MA. Is there an internal cardiac renin-angiotensin system? *Heart.* 1996;76(3):28-32.
50. Tomoaia G, Pasca RD. On the Collagen Mineralization. A Review. *Clujul Med.* 2015;88(1):15-22.
51. Wahyudi H, Reynolds AA, Li Y, Owen SC, Yu SM. Targeting collagen for diagnostic imaging and therapeutic delivery. *J Control Release.* 2016. [*Epub ahead of print*]
52. Avilés-Reyes A, Miller JH, Lemos JA, Abranches J. The Collagen Binding Proteins of *Streptococcus mutans* and Related *Streptococci*. *Mol Oral Microbiol.* 2016. [*Epub ahead of print*]
53. Horn MA, Trafford AW. Aging and the cardiac collagen matrix: Novel mediators of fibrotic remodelling. *J Mol Cell Cardiol.* 2015; 2828(15)30110-3.
54. Lopes JDM, Gomes RAS, Hial V, Lopes ICR, Reis MA, Teixeira VPA. Correlations between the collagen content of the human left ventricular myocardium, measured by biochemical and morphometric methods. *Arq Bras Cardiol.* 2002;79(1):10-9.
55. Matsubara LS, Narikawa S, Ferreira ALA, Paiva SAR, Zornoff LM, Matsubara BB. Remodelação miocárdica na sobrecarga crônica de pressão e volume no coração de ratos. *Arq Bras Cardiol.* 2006;86(2):126-30.
56. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Junções celulares, adesão celular e matriz extracelular. In: Alberts B. *Biologia molecular da célula.* 5th ed. Porto Alegre: Artmed; 2010;1131-204.
57. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens-structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55(12):1531-46.

58. Zhang Y, Stefanovic B. LARP6 meets collagen mRNA: specific regulation of type I collagen expression. *Int J Mol Sci.* 2016;17(3):419.
59. Murphy G, Knauper V. Relating matrix metalloproteinase structure to function: Why the hemopectin domain? *Matrix Biol.* 1997; 15(8-9):511-8.
60. Berg G, Schreier L, Miksztowicz V. Circulating and adipose tissue matrix metalloproteinases in cardiometabolic risk environments: pathophysiological aspects. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2014;17(2):79-87.
61. Horn MA. Cardiac physiology of aging: extracellular considerations. *Compr Physiol.* 2015;5(3):1069-121.
62. Ma Y, Halade GV, Zhang J, Ramirez TA, Levin D, Voorhees A, et al. Matrix metalloproteinase-28 deletion exacerbates cardiac dysfunction and rupture after myocardial infarction in mice by inhibiting M2 macrophage activation. *Circ Res.* 2013;112(4):675-88.
63. Polyakova V, Loeffler I, Hein S, Miyagawa S, Piotrowska I, Dammer S, et al. Fibrosis in endstage human heart failure: severe changes in collagen metabolism and MMP/TIMP profiles. *Int J Cardiol.* 2011;151(1):18-33.
64. Guimarães DA, Rizzi E, Ceron CS, Martins-Oliveira A, Gerlach RF, Santos JET. Inhibition of matrix metalloproteinases: a possible therapeutic strategy in arterial hypertension? *Rev Bras Hipertens.* 2010;17(4):226-30.
65. Mann DL. Heart failure. Philadelphia:Saunders;2004.
66. Bader M. Role of the local renin-angiotensin system in cardiac damage: a minireview focussing on transgenic animal models. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34(11):1455-62.
67. Chen J, Mehta JL. Angiotensin II mediated oxidative stress and procollagen-1 expression in cardiac fibroblasts: blockade by pravastatin and pioglitazone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291(4):H1738-45.
68. Lijnen PJ, Petrov VV. Role of intracardiac renin-angiotensin-aldosterone system in extracellular matrix remodeling. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2003;25(7):541-64.
69. Neves MF, Amiri F, Virdis A, Diep QN, Schiffrin EL. CIHR multidisciplinary research group on hypertension. Role of aldosterone in angiotensin II-induced cardiac and aortic inflammation, fibrosis, and hypertrophy. *Can J Physiol Pharmacol.* 2005;83(11):999-06.
70. Li WJ, Liu Y, Wang JJ, Zhang YL, Lai S, Xia YL, et al. "Angiotensin II memory" contributes to the development of hypertension and vascular injury via activation of NADPH oxidase. *Life Sci.* 2016;149(1):18-24.
71. Silva DCT, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Campos DH, Nascimento AF, Oliveira Junior SA, et al. Influence of term of exposure to high-fat diet-induced obesity on myocardial collagen type I and III. *Arq Bras Cardiol.* 2014;102(2):157-63.

72. Guglielmi V, Cardellini M, Cinti F, Corgosinho F, Cardolini I, D'Adamo M, et al. Omental adipose tissue fibrosis and insulin resistance in severe obesity. *Nutr Diabetes*. 2015;5(1):e175.
73. Adapala VJ, Adedokun SA, Considine RV, Ajuwon KM. Acute inflammation plays a limited role in the regulation of adipose tissue COL1A1 protein abundance. *J Nutr Biochem*. 2012;23(6):567-72.
74. Nie J, Bradshaw AD, Delany AM, Sage EH. Inactivation of SPARC enhances high-fat diet-induced obesity in mice. *Connect Tissue Res*. 2011;52(2):99-08.
75. Patsch JM, Kiefer FW, Varga P, Pail P, Rauner M, Stupphann D, et al. Increased bone resorption and impaired bone microarchitecture in short-term and extended high-fat diet-induced obesity. *Metabolism*. 2011;60(2):243-9.
76. Lo L, McLennan SV, Williams PF, Bonner J, Chowdhury S, McCaughan GW, et al. Diabetes is a progression factor for hepatic fibrosis in a high fat fed mouse obesity model of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2011;55(2):435-44.
77. Szczęsny W, Szczepanek J, Tretyn A, Dąbrowiecki S, Szmytkowski J, Polak J. An analysis of the expression of collagen I and III genes in the fascia of obese patients. *J Surg Res*. 2015;195(2):475-80.
78. Lancha A, Rodríguez A, Catalán V, Becerril S, Sáinz N, Ramírez B et al. Osteopontin deletion prevents the development of obesity and hepatic steatosis via impaired adipose tissue matrix remodeling and reduced inflammation and fibrosis in adipose tissue and liver in mice. *PLoS One*. 2014;9(5):e98398.
79. Martínez- Martínez E, Miana M, Jurado- López R, Rousseau E, Rossignol P, Zannad F, et al. A role for soluble ST2 in vascular remodeling associated with obesity in rats. *PLoS One*. 2013;8(11):e79176.
80. Minullina IR, Alexeyeva NP, Anisimov SV, Puzanov MV, Kozlova SN, Sviryaev YV, et al. Transcriptional changes in bone marrow stromal cells of patients with heart failure. *Cell Cycle*. 2014;13(9):1495-500.
81. De Lorgeril M, Salen P. New insights into the health effects of dietary saturated and omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids. *BMC Medicine*. 2012;10(1):50.
82. Oliveira Junior SA, Padovani CR, Rodrigues SA, Silva NR, Martinez PF, Campos DH, et al. Extensive impact of saturated fatty acids on metabolic and cardiovascular profile in rats with diet-induced obesity: a canonical analysis. *Cardiovasc Diabetol*. 2013;12(1):65.
83. German JB, Dillard CJ. Saturated fats: what dietary intake? *Am J Clin Nutr*. 2004;80(3):550-9.
84. Dyntar D, Eppenberger-Eberhardt M, Maedler K, Pruschy M, Eppenberger HM, Spinass GA, et al. Glucose and palmitic acid induce degeneration of myofibrils and modulate apoptosis in rat adult cardiomyocytes. *Diabetes*. 2001;50(9):2105-13.

85. De Vries JE, Vork MM, Roemen TH, de Jong YF, Cleutjens JP, van der Vusse GJ, et al. Saturated but not mono-unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in neonatal rat ventricular myocytes. *J Lipid Res.* 1997;38(7):1384-94.
86. Sparagna GC, Hickson-Bick DL, Buja LM, McMillin JB. A metabolic role for mitochondria in palmitate-induced cardiac myocyte apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279(5):H2124-32.
87. Hickson-Bick DL, Buja LM, McMillin JB. Palmitate-mediated alterations in the fatty acid metabolism of rat neonatal cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32(3):511-9.
88. Hickson-Bick DL, Sparagna GC, Buja LM, McMillin JB. Palmitate-induced apoptosis in neonatal cardiomyocytes is not dependent on the generation of ROS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282(2):H656-64.
89. Jeckel KM, Miller KE, Chicco AJ, Chapman PL, Mulligan CM, Falcone PH, et al. The role of dietary fatty acids in predicting myocardial structure in fat-fed rats. *Lipids Health Dis.* 2011;10(1):92.
90. Jalili T, Manning J, Kim S. Increased translocation of cardiac protein kinase C beta2 accompanies mild cardiac hypertrophy in rats fed saturated fat. *J Nutr.* 2003;133(2):358-61.
91. Xue B, Yu Y, Zhang Z, Guo F, Beltz TG, Thunhorst RL, et al. Leptin Mediates High-Fat Diet Sensitization of Angiotensin II-Elicited Hypertension by Upregulating the Brain Renin-Angiotensin System and Inflammation. *Hypertension.* 2016;67(5):970-6.

A OBESIDADE POR DIETA HIPERLIPÍDICA SATURADA AUMENTA OS COLÁGENOS I E III MIOCÁRDICO VIA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR AT1

Danielle Cristina Tomaz da Silva-Bertani¹, Danielle Fernandes Vileigas¹, Paula Paccielli Freire², Loreta Casquel de Tomasi¹, Dijon Henrique Salomé de Campos¹, Scarlet Marques de Oliveira¹, Camila Renata Correa³, Paula Grippa Sant'Ana¹, Tiago Fernandes⁴, Edilamar Menezes de Oliveira⁴, Carlos Roberto Padovani⁵, Antônio Carlos Cicogna¹

¹Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP, Botucatu/São Paulo- Brasil.

²Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista - "Júlio de Mesquita Filho", UNESP, Botucatu/São Paulo- Brasil.

³Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP, Botucatu/São Paulo- Brasil.

⁴Departamento de Bioquímica da Escola de Educação Física e Esporte - Universidade de São Paulo, USP, São Paulo/São Paulo- Brasil.

⁵Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista - "Júlio de Mesquita Filho", UNESP, Botucatu/São Paulo- Brasil.

Endereço para correspondência:

Danielle Cristina Tomaz da Silva-Bertani
Faculdade de Medicina de Botucatu
Departamento de Clínica Médica
Distrito de Rubião Júnior s/n – 18.618-000 – Botucatu – SP – Brasil
E-mail: dany.tomaz@gmail.com

Resumo

A obesidade se associa a inúmeros distúrbios modulados pelo sistema renina angiotensina (SRA) e embora exista uma extensa literatura mostrando a relação entre a angiotensina II e o metabolismo do colágeno miocárdico, não encontramos informações relacionando obesidade por dieta hiperlipídica, saturada, colágenos tipos I e III miocárdico e angiotensina-II. Em razão desta constatação e da associação deletéria entre ácidos graxos saturados e sistema cardiovascular, a proposta deste estudo foi testar a hipótese que a obesidade por dieta hiperlipídica saturada, aumenta os colágenos I e III cardíaco via ativação do receptor AT₁ do SRA oriundo do excesso de tecido adiposo. Ratos *Wistar* machos, com 30 dias, foram randomizados em dois grupos: controle(C; n=30) e obeso (Ob; n=30). Os ratos C receberam dieta normolipídica (DN) e os Ob, dieta hiperlipídica (DH), ambas ricas em ácidos graxos saturados por 30 semanas. Após esse período de intervenção dietética, cada grupo foi randomizado em dois subgrupos: DN e DN+Losartan(Los); DH e DH+Los; os subgrupos DN e DH continuaram recebendo as respectivas dietas durante mais 5 semanas e os grupamentos DN+Los e DH+Los, além do suporte nutricional, foram tratados com losartan, um fármaco antagonista de receptores AT₁ na dosagem diária de 30 mg/Kg de massa corporal, portanto, o período total do experimento foi de 35 semanas. Foram avaliados os perfis nutricionais e metabólicos. A avaliação cardíaca foi realizada *post mortem* por análise macroscópica e molecular, esta última através dos níveis proteicos dos colágenos tipos I e III, inibidores teciduais de MMPs (TIMPs) 1 e 2; e receptor AT₁, da concentração da angiotensina II, fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e da atividade da metaloproteinase (MMP)-2 e da enzima conversora de angiotensina II (ECA). Também foi analisado a angiotensina II e a atividade da ECA circulante e do tecido adiposo visceral. Os resultados foram analisados por meio de ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$). A obesidade acarretou aumento no peso corporal final, gordura corporal total e índice de adiposidade. Foram visualizadas algumas comorbidades, como hipertensão arterial sistólica, menor tolerância à glicose, resistência insulínica, hiperinsulinemia e hiperleptinemia, as quais foram minimizadas por meio do bloqueio do losartan. Em relação à avaliação cardíaca, a obesidade aumentou os níveis proteicos do receptor AT₁, porém, não alterou a angiotensina II e a atividade da ECA. A administração de losartan nos grupos C e Ob ocasionou diminuição no receptor AT₁ em relação aos grupos não tratados, entretanto, ocorreu o oposto na angiotensina II e na ECA em ambos os grupos; os animais Ob+Los apresentaram maiores níveis proteicos de receptor AT₁ em relação aos C+Los. A obesidade não acarretou efeitos pressóricos significativos na 30ª

semana; porém, na 35ª semana, o grupo Ob apresentou aumento da pressão arterial e da expressão proteica dos colágenos tipo I e III, os quais foram amortizados pelo losartan. O TGF- β , os TIMPs 1 e 2 foram maiores no grupo Ob, porém, a atividade da MMP-2 foi menor nesses animais. O fármaco acarretou aumento dos TIMPs e diminuição na MMP-2 nos animais Ob em relação aos C. A obesidade acarretou aumento da concentração da Ang-II e da atividade da ECA plasmática e do tecido adiposo visceral; a administração de losartan no grupo Ob ocasionou redução nessas variáveis plasmática em relação ao grupo Ob não tratado. Com o losartan, a angiotensina II visceral mostrou-se reduzida em ambos os grupos, porém, a atividade da ECA foi reduzida apenas nos animais obesos. Em conclusão, a obesidade por dieta hiperlipídica saturada aumenta os colágenos I e III cardíaco, via receptor AT1, consequente à elevação da angiotensina II circulante, proveniente do excesso de secreção pelo tecido adiposo visceral.

Palavras-chave: obesidade, dieta hiperlipídica saturada, colágeno I e III cardíaco, sistema renina angiotensina, ratos

Abstract

Obesity is associated with numerous disorders modulated by renin angiotensin system (RAS) and although there is an extensive literature showing the relationship between angiotensin II and the metabolism of myocardial collagen, could not find information relating obesity by saturated high-fat diet, myocardial collagen I and III and angiotensin-II. Because of this finding and the deleterious association between saturated fatty acids and cardiovascular system, the purpose of this study was to test the hypothesis that obesity by saturated high-fat diet increase myocardial type I and III collagen by activation of AT₁ receptor of the renin-angiotensin system. Thirty-day-old male Wistar rats were randomized into two groups: control (C; n=30), fed a standard diet and obese (Ob; n=30), fed a high-fat diet rich saturated fatty acids by 30 weeks. After 30 weeks of dietary intervention, each group were randomized into two subgroups: C and C+Losartan(Los); Ob and Ob+Los; the subgroups C and Ob continued to receive their respective diets for over a five week and the C+Los and Ob+Los groups addition of nutritional support, were treated with losartan, an antagonist drug of AT₁ receptors in daily dosage of 30mg/kg body weight. After this period of 35 weeks, it was analyzed nutritional and metabolic profiles. It was analyzed systolic blood pressure (SBP) and structural and molecular studies; the hypertrophy was assessed post-death by macroscopic analysis and the molecular, through protein levels of type I and III collagen, inhibitors of MMPs tissue (TIMPs) 1 and 2; and AT₁ receptor, the concentration of angiotensin II, beta transforming growth factor (TGF- β) and activity of metalloproteinase (MMP) -2 and angiotensin II converting enzyme (ACE). Angiotensin- II and activity of ACE in the circulation and visceral adipose tissue was also analyzed. Statistical analysis: ANOVA and Tukey's test ($p < 0,05$). The final body weight, total body fat and adiposity index were elevated in both obese groups. In contrast, obesity was associated with disorders of glucose metabolism, insulin and leptin, which were minimized by blocking of AT₁ receptor. Taking into account cardiovascular profile, SBP was elevated in Ob group compared to C and reduced in both groups treated with losartan. Obesity increased the protein levels of the AT₁ receptor, however, did not alter the angiotensin II and ACE activity. Losartan administration in C and Ob groups caused decrease in AT₁ receptor, however, occurred the opposite in angiotensin II and ACE in both groups; Ob+Los animals showed higher AT₁ receptor protein levels compared to C+Los. In relation to myocardial type I and III collagen, Ob group exhibited higher expression of these proteins compared to C, and both groups treated with

losartan showed lower levels of these collagen in relation to non-medicated counterparts. TGF- β , TIMPs 1 and 2 were higher in Ob group, however, MMP-2 activity was lower in these animals. The drug promoted an increase of TIMP and decrease of MMP-2 in Ob animals. Obesity caused an increase of the Ang-II concentration and ACE activity in circulation and visceral adipose tissue; losartan in Ob group promoted reduction in these plasma variables in relation to Ob untreated group. With losartan, visceral angiotensin II was reduced in both groups, however, ACE activity was lower only in the obese animals. In conclusion, the obesity by saturated high-fat diet increase myocardial type I and III collagen by AT₁ receptor, consequent to rise circulating angiotensin II from excess secretion by visceral adipose tissue.

Keywords: obesity, saturated high-fat diet, myocardial type I and III collagen, renin angiotensin system, rats

INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica metabólica caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura em relação à massa magra tecidual⁽¹⁾. É uma epidemia global, sua incidência e prevalência tem aumentado progressivamente nas últimas décadas⁽¹⁻⁴⁾. É um dos principais fatores de risco para doenças crônicas e incapacitantes, as quais estão relacionadas com redução da expectativa de vida e aumento do risco de mortalidade, representando um grave problema de saúde pública^(1,5,6-9).

O tecido adiposo é considerado um importante órgão endócrino, parácrino e autócrino que secreta diversas substâncias, com múltiplas funções, conhecidas como adipocinas, por exemplo, leptina, adiponectina, citocinas pró e anti-inflamatórias e componentes do sistema renina angiotensina (SRA)⁽¹⁰⁻²⁰⁾. Esse sistema, que se encontra exacerbado na obesidade^(10,11,14,16-18,21,22), é considerado um eixo endócrino, com importante participação na homeostasia do sistema cardiovascular^(21,23-27). A angiotensina II, principal componente do SRA, atua através de ligações a receptores específicos, denominados AT1 e AT2, possuindo importante papel na regulação da pressão arterial e proliferação dos miócitos e dos fibroblastos cardíacos^(21,23, 26,28,29). A literatura mostra que os componentes do SRA são sintetizados em diversos órgãos^(23,29-34), inclusive no coração, o qual pode produzir concentrações de angiotensina II até três vezes maiores do que as encontradas no plasma⁽³⁴⁾. Enquanto o SRA circulante exerce um efeito predominantemente agudo e hemodinâmico, o sistema tecidual miocárdico está envolvido em efeitos de longa duração, como a remodelação cardíaca⁽³¹⁾, caracterizada, entre outros, pela alteração da matriz intersticial.

O colágeno é um dos principais componentes da matriz extracelular, tendo sido identificado mais de 20 tipos⁽³⁵⁻³⁷⁾, sendo que no miocárdio há o predomínio dos tipos I e III, representando cerca de 80% e 10% do colágeno total, respectivamente^(38,39). Essa proteína, que contribui para a manutenção da arquitetura e função cardíaca^(38,40) é sintetizada pelos

fibroblastos, os quais também produzem as metaloproteinases de matriz (MMPs)⁽³⁸⁾, responsáveis pela degradação do colágeno, que são reguladas, entre outros, pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs)^(38,41,42).

Embora exista uma extensa literatura analisando o metabolismo do colágeno miocárdico e angiotensina II⁽⁴³⁻⁹⁷⁾, e também, o comportamento dos colágenos I e/ou III em diferentes tecidos e protocolos experimentais de obesidade⁽⁴⁸⁻⁵⁷⁾, não encontramos dados relacionando colágenos I e III miocárdico, angiotensina II e obesidade por dieta hiperlipídica saturada. Em razão desta constatação e da associação deletéria entre ácidos graxos saturados e sistema cardiovascular⁽⁵⁸⁻⁶⁷⁾, o objetivo deste estudo foi testar a hipótese que a obesidade por dieta hiperlipídica saturada, aumenta os colágenos I e III cardíaco via ativação do receptor AT1 do SRA oriundo do excesso de tecido adiposo. Essa afirmação baseia-se no fato que a obesidade promove elevação do SRA circulante^(10,11,14,16-18,21,22,68), que ao atingir o coração, via receptores AT1, induz o aumento dos colágenos I e III. Para consolidar este preceito, foi realizado o bloqueio do receptor AT1 pela administração do fármaco Losartan.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e protocolo experimental

Foram utilizados ratos *Wistar*, com 60 dias de idade, provenientes da Anilab Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda – Paulínia, São Paulo, Brasil. Os animais foram alojados em gaiolas individuais, com controle de temperatura ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade ($55 \pm 5\%$) e luminosidade (ciclos claro/escuro de 12 horas). Após 7 dias de aclimatação, os ratos foram randomizados em dois grupos: controle (C; n=30) e obeso (Ob; n=30). Os grupos C e Ob receberam dietas normolipídica (DN) e hiperlipídica (DH), respectivamente, ambas ricas em ácidos graxos saturados. Após as 30 semanas de intervenção dietética, cada grupo foi randomizado em dois subgrupos: C e C +Losartan(Los); Ob e Ob+Los; os subgrupos C e Ob continuaram recebendo as respectivas dietas durante mais um ciclo de cinco semanas e os grupamentos C+Los e Ob+Los, além do suporte nutricional, foram tratados com losartan, fármaco antagonista de receptores AT_1 , na dosagem diária de 30 mg/Kg de massa corporal⁽⁶⁸⁾. O medicamento foi administrado junto à água ingerida, na proporção de 0,5 a 0,75g por litro de água, respectivamente. Estas diferentes diluições foram pautadas em estudo anterior, em nosso laboratório⁽⁶⁸⁾. Além de bloquear o acoplamento sarcolemal da Ang-II, na dosagem prescrita, a administração de losartan inibe a ação endógena da ECA, reduzindo a formação local de Ang-II⁽⁶⁹⁾. O período experimental total de obesidade foi de 35 semanas. Os ratos tiveram livre acesso às dietas e à água. Os experimentos e procedimentos foram realizados conforme o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* publicado pelo *National Research Council*⁽⁷⁰⁾ e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP, Botucatu, SP, Brasil), protocolo CEUA 991/2012.

Dietas

As rações, idealizadas na Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX), Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, foram adaptadas a partir de modelo dietético utilizado anteriormente pelo grupo⁽⁷¹⁾ e manipuladas com a parceria da empresa Biotron Zootecnica® (Rio Claro, São Paulo, Brasil). Foram utilizados os seguintes ingredientes: farelo e casca de soja, milho, dextrina, óleos de soja e palmíste e premix vitamínico e mineral. A composição dos nutrientes e a distribuição dos macronutrientes estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Composição de nutrientes (%) e distribuição percentual dos macronutrientes em relação ao valor calórico total (% calorias) das dietas.

	Dietas	
	Normolipídica	Hiperlipídica
Proteína	24 (31,0)	18 (18,7)
Carboidrato	40 (51,6)	40 (41,6)
Gordura	6 (17,4)	17 (39,7)
Fibras	12	9
Outros*	18	16
Calorias (kcal/g)	3,10	3,85
Ácidos graxos saturados	61,5	64,8
Ácidos graxos insaturados	38,5	35,2

* Outros: umidade, vitaminas e minerais.

Perfil nutricional

O perfil nutricional foi determinado pela ingestão alimentar e calórica, eficiência alimentar, peso e gordura corporal e índice de adiposidade. A ingestão alimentar foi calculada semanalmente a partir da sobra de ração de cada animal. O consumo calórico foi determinado pela seguinte fórmula: ingestão alimentar semanal multiplicada pelo valor energético de cada dieta (g x kcal). Com a finalidade de analisar a capacidade do animal converter a energia alimentar consumida em peso corporal, foi calculada a eficiência alimentar (EA), dividindo-se o ganho total de peso corporal dos animais (g) pela energia total ingerida (Kcal). O peso corporal dos animais foi aferido semanalmente. A quantidade de gordura corporal total foi

determinada pela somatória dos depósitos epididimal, retroperitoneal e visceral; o índice de adiposidade foi calculado pela soma dos depósitos de gordura (epididimal, retroperitoneal e visceral) normalizada pelo peso corporal final multiplicado por 100⁽⁷²⁻⁷⁴⁾.

Comorbidades

Como a obesidade induzida por dieta, em modelo animal, pode acarretar algumas comorbidades associadas à obesidade humana, como, hipertensão arterial sistêmica, menor tolerância à glicose, resistência insulínica, hiperglicemia, dislipidemias, hiperinsulinemia e hiperleptinemia^(71,75-77), as seguintes variáveis foram analisadas ao final do período experimental:

Pressão arterial sistólica (PAS)

A PAS foi aferida por pletismografia de cauda, utilizando-se eletro-esfigmomanômetro Narco Bio-System®, modelo 709-0610 (International Biomedical, Austin, TX, USA). Os ratos foram previamente aquecidos, à temperatura de 40°C por cinco minutos, para produzir vasodilatação da artéria caudal. O manguito foi insuflado até atingir pressão de 200 mmHg e, posteriormente, desinsuflado; as pulsações arteriais foram registradas em sistema de aquisição de dados computadorizado (Acq Knowledge® MP100, Biopac Systems, Ins, Santa Barbara, CA, USA). As mensurações pressóricas foram tomadas em dois momentos: após à 30ª e 35ª semanas de obesidade.

Teste de tolerância à glicose (TTG) e índice do modelo homeostático para avaliar resistência insulínica (HOMA-IR)

Após um período de jejum de seis horas, as coletas de sangue, para dosagem de glicemia, foram realizadas na artéria caudal na condição basal e após 15, 30, 60, 90 e 120

minutos da administração intraperitoneal de glicose 30% (Sigma-Aldrich,[®] St Louis, MO, USA), equivalente a 2,0 g/kg de peso corporal. A mensuração dos níveis glicêmicos foi realizada com glicosímetro portátil Accu-Chek Go Kit (Roche DiagnosticBrazil Ltda., São Paulo, Brasil). O TTG foi avaliado pelo perfil da curva glicêmica e área sob a curva (AUC) para glicose. O índice HOMA-IR foi calculado de acordo com a fórmula: $HOMA-IR = [glicemia \text{ de jejum (mmol/l)} \times insulinemia \text{ de jejum } (\mu U/ml)] / 22,5^{(78,79)}$.

Perfil lipídico e hormonal sérico

Os animais foram colocados em jejum por 12 horas, anestesiados (cloridrato de ketamina, 50mg/kg/ip; cloridrato de xilazina, 10mg/kg/ip) e eutanasiados por decapitação. As concentrações séricas de triacilglicerol, colesterol total, lipoproteínas de alta e baixa densidade foram determinadas utilizando-se kits específicos (BIOCLIN[®], Belo Horizonte, MG, Brasil) e analisadas pelo método enzimático colorimétrico automatizado (ChemistryAnalyzer BS-200, Mindray Medical International Limited, Shenzhen, China) e os níveis de ácidos graxos livres não esterificados foram avaliados por kit colorimétrico (WAKO PureChemical Industries Ltd, Osaka, Japão). Os níveis hormonais de insulina e leptina foram determinados pelo método de ELISA utilizando-se kits específicos (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) e a leitura foi realizada com auxílio de leitor de microplaca (Spectra MAX 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Análise morfológica e molecular cardíaca

O perfil morfológico foi analisado *pos mortem* por macroscopia, através do peso dos átrios, ventrículos esquerdo e direito, e suas respectivas relações com o comprimento da tíbia. O estudo molecular, realizado no ventrículo esquerdo, por meio da análise da angiotensina II, receptor AT1, enzima conversora da angiotensina (ECA), colágenos I e III, fator de

transformação de crescimento beta (TGF- β), metaloproteinase (MMP)-2, inibidor da metaloproteinase (TIMPs)- 1 e 2. A angiotensina II foi determinada pelo método de ELISA utilizando-se kit específico (CSB-E04494r – CUSABIO, Wuhan, China). Cada amostra foi analisada em triplicata e a leitura foi realizada com auxílio de leitor de micro-placa (Spectra MAX 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). O nível proteico do receptor AT-1 foi analisado pela técnica de Western Blotting, descrita em trabalhos anteriores^(48,80). Anticorpo primário: (1:100; Abcam, Cambridge, MA, USA) e β -actina, proteína de normalização, (1:1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). A determinação da atividade da ECA foi realizada de acordo com Alves et al.⁽⁸¹⁾, no Laboratório de Bioquímica da Escola de Educação Física e Esporte - Universidade de São Paulo, São Paulo/SP. A atividade enzimática foi normalizada pelo conteúdo de proteína de cada amostra, determinada pelo método de Bradford e expressa em uF/ min/ mg de proteína (1mU = nmol de Abz-FRK (Dnp) P-OH hidrolisados por minuto). A expressão proteica dos colágenos tipos I e III e dos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs)1 e 2 dos animais foi avaliada pela técnica de Western Blotting. Anticorpos primários: colágenos I e III (1:100; Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), TIMPs-1 e 2 (1:100; Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) e β -actina, proteína de normalização, (1:1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). A concentração do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) foi analisada pelo método de ELISA utilizando-se kit específico (MB100B - R&D systems, Minneapolis, MN). Cada amostra foi analisada em triplicata e a leitura foi realizada com auxílio de leitor de micro-placa (Spectra MAX 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). A atividade da metaloproteinase (MMP)-2 foi determinada por Zimografia previamente relatada por Tyagi et al.⁽⁸²⁾.

Análise molecular plasmática e no tecido adiposo visceral

A angiotensina II foi determinada pelo método de ELISA utilizando-se kit específico (CSB-E04494r – CUSABIO, Wuhan, China). Cada amostra foi analisada em triplicata e a leitura foi realizada com auxílio de leitor de micro-placa (Spectra MAX 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Para a determinação da angiotensina plasmática, o sangue foi rapidamente coletado em eppendorf contendo uma mistura de inibidores de protease (EDTA, pepstatina A e ácido 4-cloromercuribenzoico) para prevenir a produção *in vitro* e a degradação dos peptídeos de angiotensina. A quantidade de proteínas totais no tecido adiposo visceral foi determinada pelo método de Bradford, usando albumina bovina como padrão (Bio-Rad Protein Assay). A determinação da atividade da ECA foi realizada de acordo com Alves et al.⁽⁸¹⁾, no Laboratório de Bioquímica da Escola de Educação Física e Esporte - Universidade de São Paulo, São Paulo/SP, como descrito anteriormente. Para o ensaio, foram utilizados 20 µL da amostra de tecido e 3 µL da amostra de soro. O resultado foi expresso em uF/ min/ mg de proteína (1mU = nmol de Abz-FRK (Dnp) P-OH hidrolisados por minuto) para o tecido e uF/ min/ mL para o soro.

Análise estatística

A pressão arterial sistólica e o teste de tolerância à glicose foram analisados por meio da técnica de análise de variância (ANOVA) para o esquema de dois fatores independentes no modelo de medidas repetidas, complementada com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni⁽⁸³⁾. As demais variáveis deste estudo foram analisadas por meio da técnica ANOVA para o esquema de dois fatores, complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey⁽⁸⁴⁾. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão e o nível de significância considerado para todas as variáveis foi de 5%.

RESULTADOS

Perfil nutricional e comorbidades

A Tabela 1 mostra que o peso corporal final, os depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e visceral, a gordura corporal total e o índice de adiposidade foram maiores nos Ob e Ob+Los em relação aos C e C+Los, respectivamente. Durante o período experimental, os animais Ob e Ob+Los ingeriram menor quantidade de ração, entretanto, a ingestão calórica e a eficiência alimentar foram maiores nestes animais em relação aos C e C+Los, respectivamente.

Tabela 1. Perfil nutricional

Variáveis	Grupo	Medicação	
		Ausente	Presente
PCF (g)	C	476 ± 56	466 ± 56
	OB	577 ± 88*	589 ± 64*
Epididimal (g)	C	8,6 ± 1,9	8,9 ± 2,4
	OB	16,3 ± 4,7*	16,4 ± 3,5*
Retroperitoneal (g)	C	7,7 ± 2,9	8,6 ± 2,8
	OB	22,1 ± 8,1*	23,3 ± 5,1*
Visceral (g)	C	6,3 ± 1,7	6,2 ± 2,4
	OB	12,7 ± 4,7*	12,7 ± 3,9*
GCT (g)	C	22,7 ± 5,5	19,5 ± 5,6
	OB	51,2 ± 16,3*	52,4 ± 11,8*
Índice de adiposidade (%)	C	5,0 ± 0,8	4,3 ± 0,8
	OB	9,3 ± 1,8*	9,1 ± 1,2*
Ingestão alimentar [#]	C	24,2 ± 2,6	23,4 ± 2,6
	OB	20,6 ± 2,0*	20,8 ± 1,9*
Ingestão calórica [#]	C	69,2 ± 8,1	68,2 ± 7,5
	OB	75,2 ± 7,5*	75,6 ± 7,1*
Eficiência alimentar [#]	C	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,2
	OB	1,6 ± 0,4*	1,7 ± 0,4*

PCF: peso corporal final; GCT: gordura corporal total. [#] semanal. C: grupo controle(n=12); C+Los: grupo controle, tratado com losartan (n=12); OB: grupo obeso (n=15); OB+Los: grupo obeso, tratado com losartan (n=12); Valores em média ± desvio padrão. ANOVA, complementada com teste de Tukey. * p<0,05 vs. C.

Pressão arterial sistólica

A Tabela 2 mostra que a obesidade não acarretou efeitos pressóricos significativos na 30ª semana; porém, na 35ª semana, os grupos Ob e Ob+Los apresentaram aumento da pressão arterial em relação aos respectivos C. Ambos os grupos tratados com losartan exibiram menores índices de pressão em relação às contrapartes não-medicadas.

Tabela 2. Pressão arterial sistólica (mmHg)

Grupo	Momentos	
	30 semanas	35 semanas
C	127 ± 7	121 ± 9 ^{aA}
C-Los	126 ± 7 ^a	101 ± 10 ^{bAB}
OB	126 ± 10	131 ± 9 ^{aB}
OB-Los	127 ± 7 ^a	108 ± 15 ^{bBβ}

C: grupo controle; C+Los: grupo controle, tratado com losartan; OB: grupo obeso; OB+Los: grupo obeso, tratado com losartan. Valores em média ± desvio padrão. ^{A,B}: comparações entre condições biométricas distintas; ^{a,b}: comparações entre condições biométricas similares; ^{a,β}: comparações entre momentos, fixado grupo; ANOVA, modelo de medidas repetidas, complementada com teste de Bonferroni; p<0,05.

Perfil lipídico, hormonal, glicêmico e HOMA-IR

A Tabela 3 mostra que as concentrações séricas de triglicérides, colesterol total, lipoproteína de baixa densidade e ácidos graxos não esterificados foram maiores nos Ob e Ob+Los em relação aos C e C+Los, respectivamente.

Tabela 3. Perfil lipídico sérico

Variáveis	Grupo	Medicação	
		Ausente	Presente
Triglicérides (mg/dL)	C	57,5 ± 7,4	59,0 ± 11,4
	OB	80,1 ± 11,8*	81,9 ± 14,1*
Colesterol total (mg/dL)	C	67,3 ± 6,0	65,0 ± 4,0
	OB	78,9 ± 5,4*	75,8 ± 8,0*
HDL (mg/dL)	C	26,4 ± 1,9	26,2 ± 2,3
	OB	27,9 ± 2,1	26,6 ± 1,3
LDL (mg/dL)	C	26,4 ± 4,8	25,7 ± 4,1
	OB	31,1 ± 5,4*	32,7 ± 6,2*
Proteína (g/dL)	C	5,5 ± 0,3	5,4 ± 0,2
	OB	5,5 ± 0,3	5,5 ± 0,3
Albumina (g/dL)	C	3,2 ± 0,1	3,2 ± 0,1
	OB	3,2 ± 0,2	3,2 ± 0,1
NEFA (mmol/L)	C	0,43 ± 0,06	0,43 ± 0,09
	OB	0,58 ± 0,09*	0,56 ± 0,08*

HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade. NEFA: ácidos graxos não esterificados. C: grupo controle, (n=12); C+Los: grupo controle, tratado com losartan (n=12); OB: grupo obeso (n=15); OB+Los: grupo obeso, tratado com losartan (n=12); Valores em média ± desvio padrão. ANOVA, complementada com teste de Tukey. * p<0,05 vs. C.

A obesidade acarretou intolerância à glicose e resistência insulínica (Figuras 1A, 1B, 1C). Os níveis glicêmicos foram semelhantes no momento basal entre os grupos; após administração intraperitoneal de glicose, os grupos Ob e Ob+Los mostraram glicemia elevada nos momentos 15, 30 e 60 minutos quando comparados aos animais C e C+Los, respectivamente (Figura 1A). Os níveis da área sob a curva do TTG (Figura 1B), do HOMA-IR (Figura 1C) e da insulina (Figura 1D) foram maiores nos Ob e Ob+Los em relação aos C e C+Los, respectivamente. Os grupos tratados com losartan exibiram áreas glicêmicas, níveis do HOMA-IR e concentrações da insulina menores em relação às contrapartes não-medicadas. A leptina (Figura 1E) foi maior nos Ob e Ob+Los em relação aos seus respectivos C e o losartan acarretou diminuição apenas no grupo Ob.

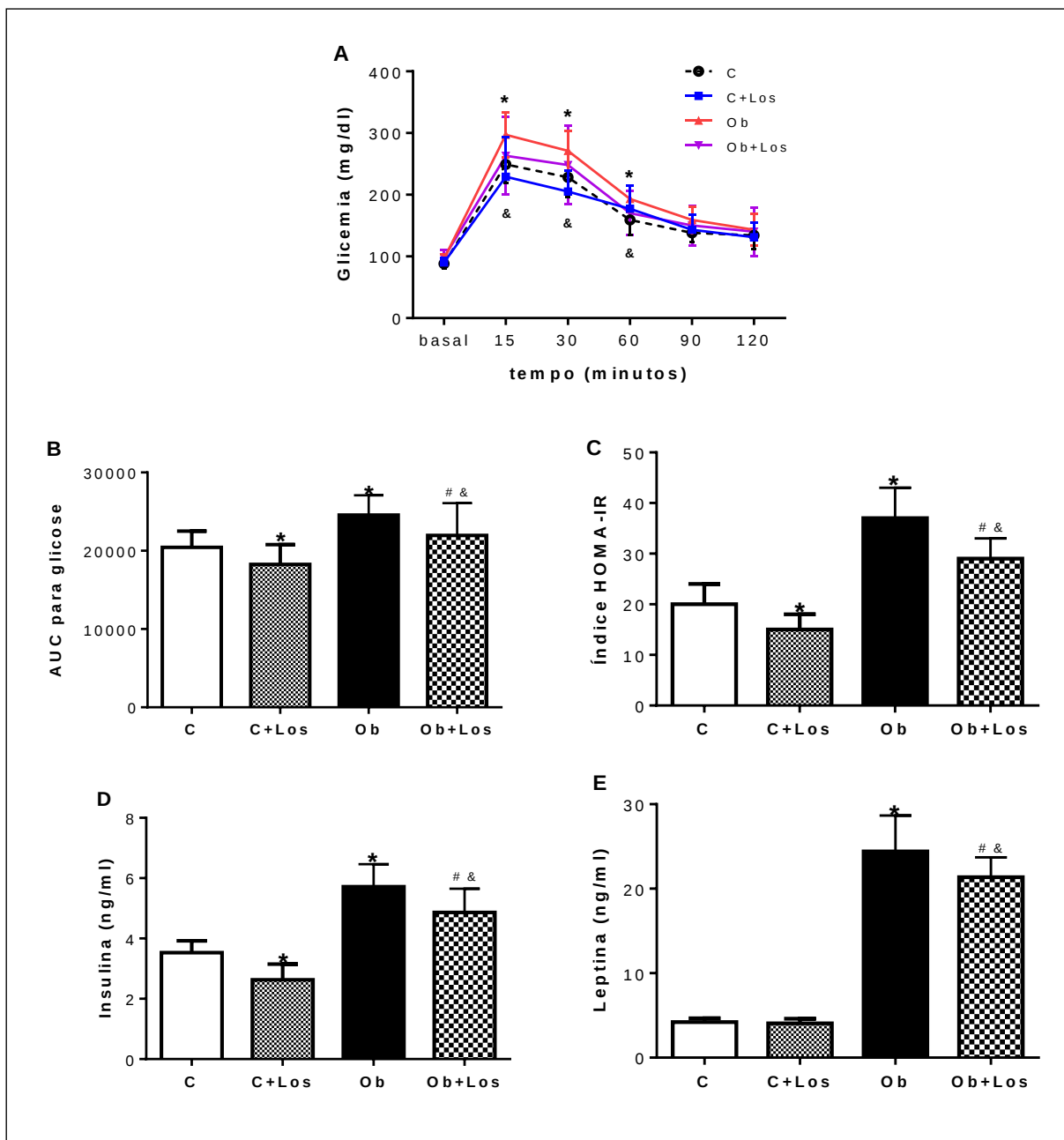


Figura 1- Perfil hormonal, glicêmico e HOMA-IR. (A) Teste de tolerância à glicose. (B) Área sob a curva do teste de tolerância à glicose. (C) Índice HOMA-IR. (D) Nível sérico de insulina. (E) Nível sérico de leptina. (A e B: C, n=12; C+Los, n=12; Ob, n=15; Ob+Los, n=12) e (C, D, E: C, n=10; C+Los, n=10; Ob, n=10; Ob+Los, n=10). C: grupo controle; C+Los: grupo controle, tratado com losartan; Ob: grupo obeso; Ob+Los: grupo obeso, tratado com losartan. Dados expressos em média $\pm$ desvio-padrão. (B, C, D, E) Análise de variância (ANOVA), complementada com teste de Tukey. (A) ANOVA para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes, complementada com o teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs. C; # $p < 0,05$ vs. Ob; & $p < 0,05$ vs. C+Los.

Análise morfológica e molecular cardíaca

A Tabela 4 mostra que átrios (AT), AT/Tíbia, ventrículo direito (VD), VD/Tíbia e ventrículo esquerdo (VE) revelaram-se aumentadas nos animais OB+Los comparados ao grupo C+Los. Em ambos os grupos, a administração de losartan ocasionou reduções nas variáveis VE e VE/Tíbia.

Tabela 4. Perfil morfológico cardíaco

Variável	Grupo	Medicação	
		Ausente	Presente (Los)
AT(g)	C	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01
	OB	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,01*
AT/Tíbia (g/m)	C	1,96 ± 0,28	1,81 ± 0,23
	OB	2,07 ± 0,24	2,19 ± 0,21*
VD (g)	C	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,03
	OB	0,22 ± 0,04	0,24 ± 0,05*
VD/Tíbia (g/m)	C	4,52 ± 0,38	4,69 ± 0,76
	OB	5,01 ± 0,80	5,33 ± 1,09*
VE (g)	C	0,79 ± 0,07	0,69 ± 0,07#
	OB	0,84 ± 0,09 **	0,76 ± 0,05*#
VE/Tíbia (g/m)	C	18,05 ± 1,60	15,91 ± 1,52#
	OB	18,75 ± 1,68	16,95 ± 1,00#

AT: átrios; VD: ventrículo direito; VE: ventrículo esquerdo; C: grupo controle, (n=12); C-Los: grupo controle, tratado com losartan, (n=12); OB: grupo obeso, (n=15); OB-Los: grupo obeso, tratado com losartan (n=12). Valores em média ± desvio padrão. ANOVA, complementada com teste de Tukey. * p<0,05 vs. C; ** p=0,053 vs. C; # p<0,05 vs. não-tratado.

A Figura 2 ilustra que a obesidade aumentou os níveis proteicos do receptor AT1 cardíaco em relação ao grupo C, porém, não alterou a concentração da angiotensina II e a atividade da ECA cardíaca. A administração de losartan nos grupos C e Ob ocasionou diminuição no receptor AT1 em relação aos grupos não tratados. Entretanto, ocorreu o oposto

na angiotensina II e na ECA em ambos os grupos C e Ob; os animais Ob+Los apresentaram maiores níveis proteicos de receptor AT 1 em relação aos C+Los.

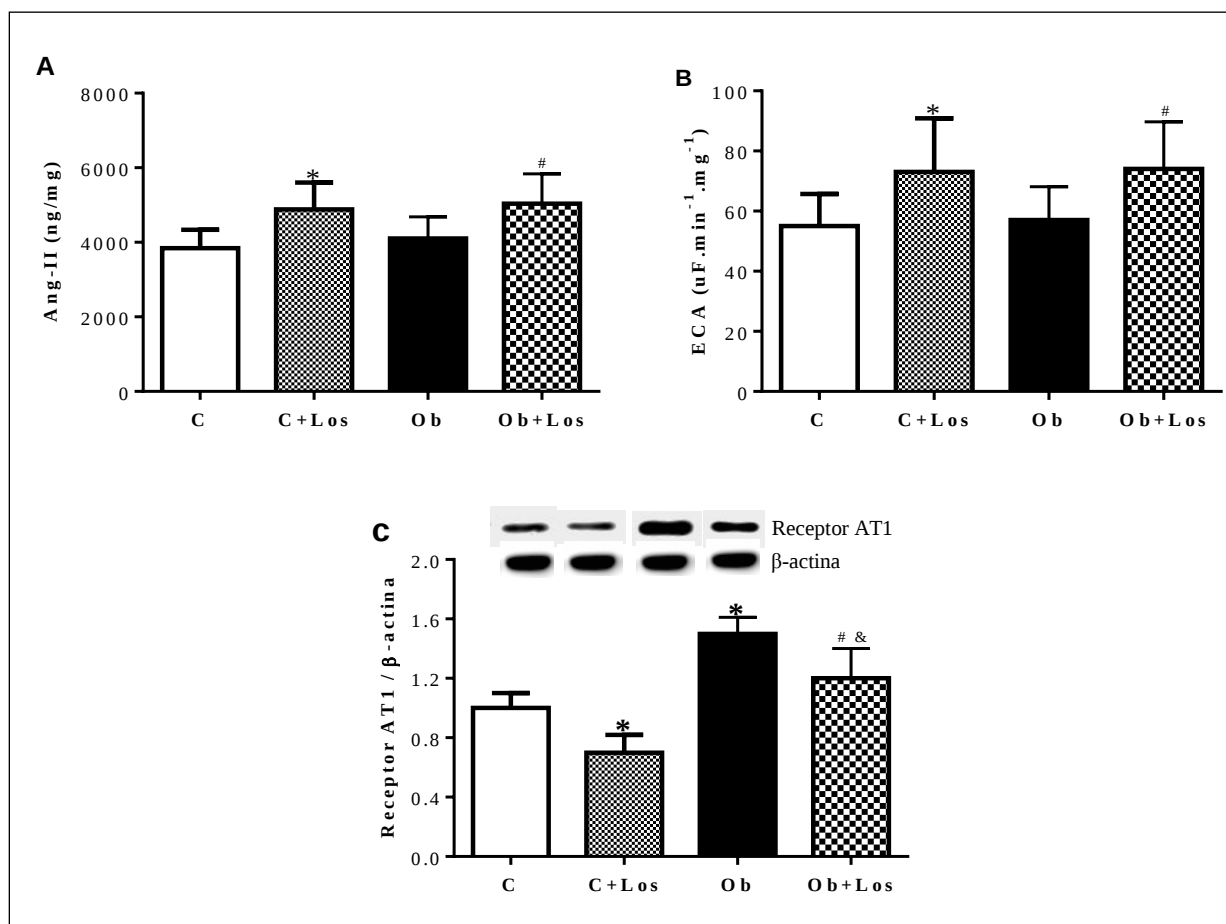


Figura 2- Sistema renina angiotensina cardíaco.(A) Concentração de angiotensina II (Ang-II) cardíaca. (B) Atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA)cardíaca. (C) Expressão proteica do receptor AT 1 cardíaco. C: grupo controle; C+Los: grupo controle, tratado com losartan; Ob: grupo obeso; Ob+Los: grupo obeso, tratado com losartan. (A e B: C,C+Los, Ob, Ob+Los;(n=9)) e (C: C,C+Los, Ob, Ob+Los;(n=6)). Dados expressos em média $\pm$ desvio-padrão. Análise de variância (ANOVA), complementada com teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs. C; # $p < 0,05$ vs. Ob; & $p < 0,05$ vs. C+Los.

A Figura 3 ilustra os níveis proteicos dos colágenos I e III no ventrículo esquerdo. Ambas as imagens mostram que os dois colágenos foram maiores no grupo Ob em relação ao C. Os grupos C e Ob tratados com losartan exibiram menores níveis de colágeno tipo I e III em relação às contrapartes não-medicadas.

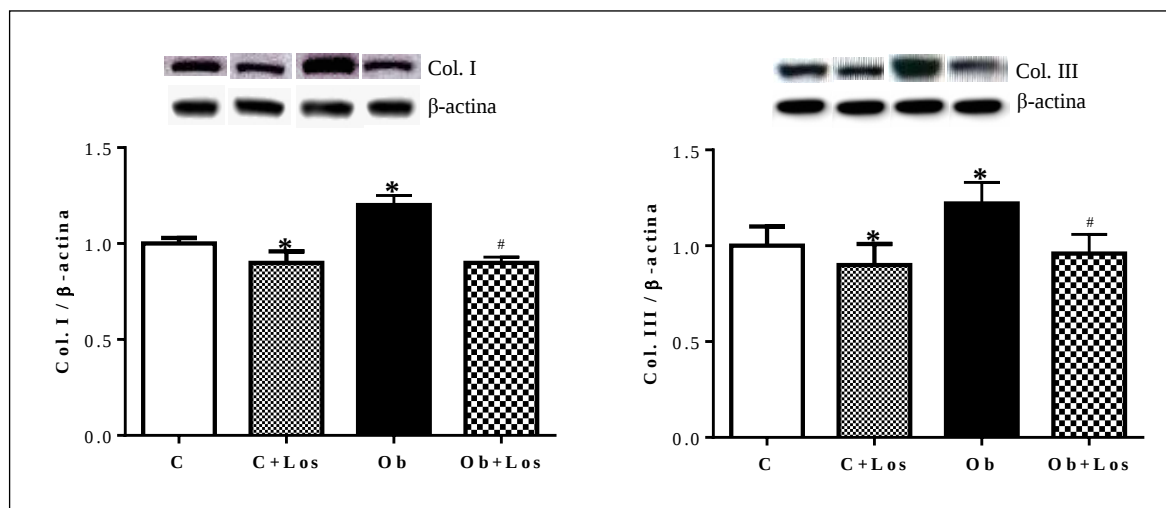


Figura 3- Expressão proteica dos colágenos I e III cardíaco. C: grupo controle, (n=06); C+Los: grupo controle, tratado com losartan, (n=06); Ob: grupo obeso, (n=06); Ob+Los: grupo obeso, tratado com losartan, (n=06). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. ANOVA, complementada com teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs. C; # $p < 0,05$ vs. Ob.

A Figura 4 mostra o comportamento do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), da metaloproteinase (MMP)-2 e dos inibidores teciduais de MMPs (TIMPs) 1 e 2 cardíaco. O TGF- β foi maior no grupo Ob em relação ao C. A atividade da MMP-2 foi menor nos animais Ob e Ob+Los em relação aos C e C+Los respectivamente, porém, os níveis protéicos dos TIMPs1 e 2 foram maiores nos grupos Ob e Ob+Los comparados aos respectivos controles.

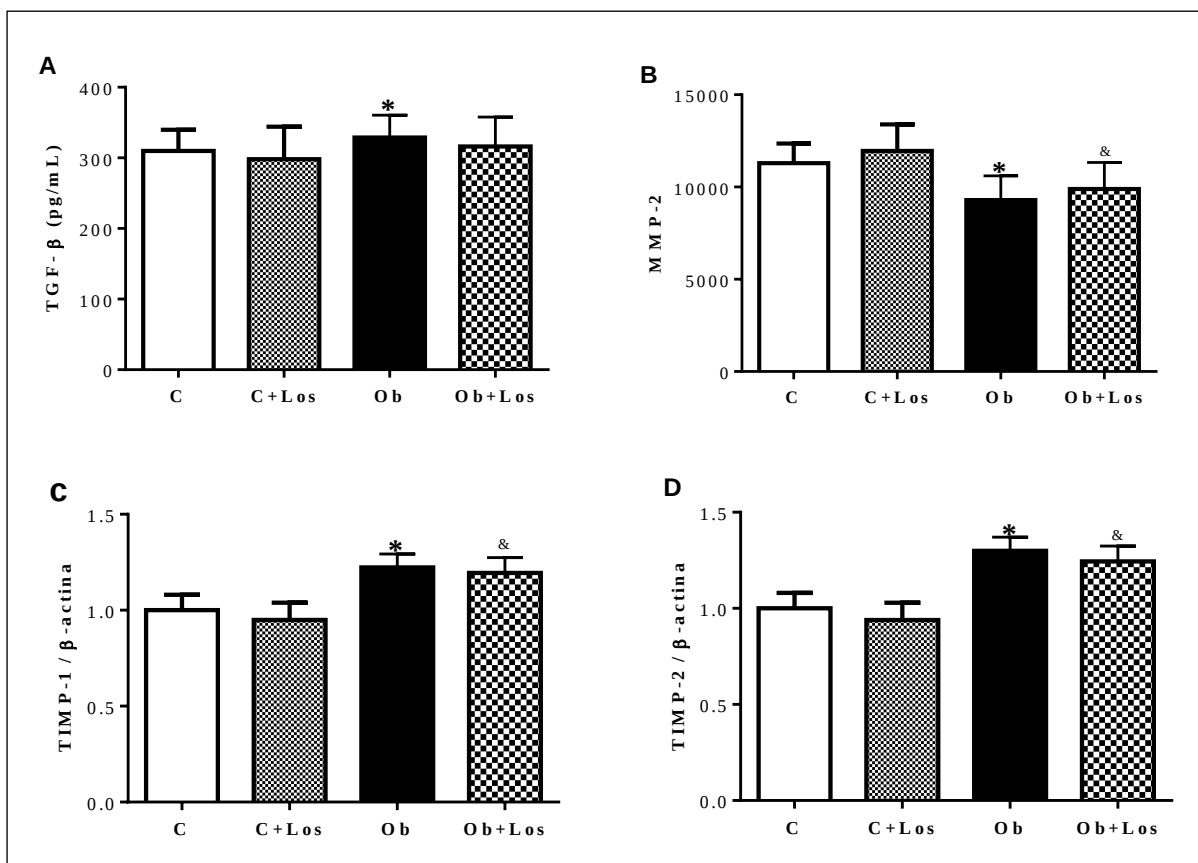


Figura 4- TGF-β, MMP-2, TIMPs 1 e 2 cardíaco. (A) Concentração do fator de transformação do crescimento beta (TGF-β). (B) Relação entre a metaloproteinase (MMP)-2 ativa e ativa intermediária e inativa. (C) Expressão proteica do inibidor tecidual de MMP (TIMP)-1 e (D) -2. C: grupo controle; C+Los: grupo controle, tratado com Losartan; Ob: grupo obeso; Ob+Los: grupo obeso, tratado com Losartan. (A: C, C+Los, Ob, Ob+Los; n=9). (B, C, D: C, C+Los, Ob, Ob+Los; n=6). Dados expressos em média ± desvio-padrão. Análise de variância (ANOVA), complementada com teste de Tukey. * p < 0,05 vs. C; & p < 0,05 vs. C+Los.

Análise molecular plasmática e no tecido adiposo visceral

A Figura 5 ilustra que a obesidade acarretou aumento na concentração da angiotensina II e na atividade da ECA plasmática (A e B) e no tecido visceral (C e D). A administração de losartan no grupo Ob ocasionou redução na angiotensina II e na ECA plasmática em relação ao grupo Ob não tratado (A e B). Em relação ao tecido adiposo visceral, o fármaco acarretou redução na angiotensina II nos animais C e Ob, e a atividade da ECA no Ob+Los também se mostrou reduzida em relação ao grupo Ob; ambas variáveis foram maiores nos Ob+Los em relação aos C+Los (C e D).

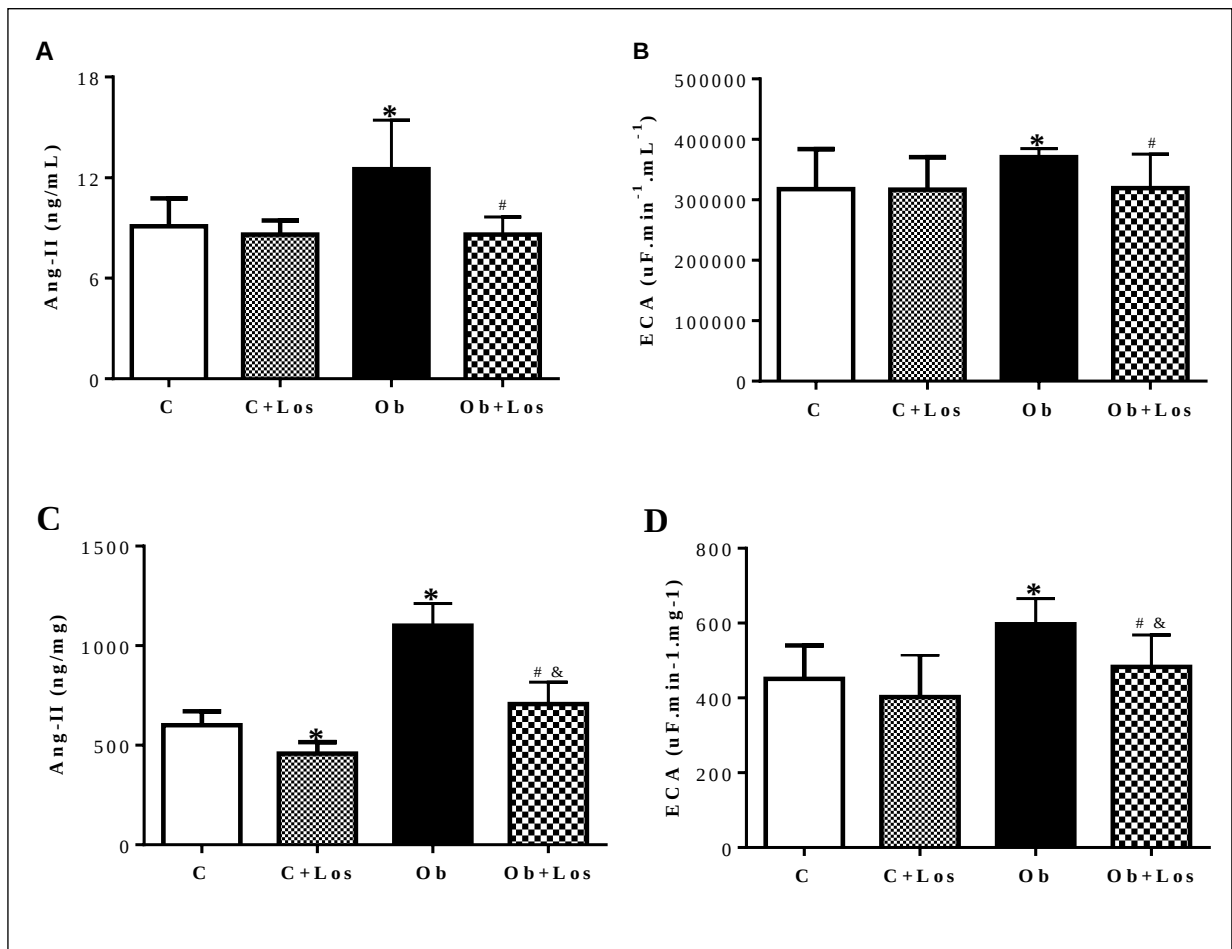


Figura 5- Sistema renina angiotensina plasmático e visceral. (A)Concentração de angiotensina II (Ang-II) plasmática. **(B)**Atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) plasmática. **(C)**Concentração de Ang-II visceral. **(D)**Atividade da ECA visceral. C: grupo controle (n=9); C+Los: grupo controle, tratado com losartan (n=9); Ob: grupo obeso (n=9); Ob+Los: grupo obeso, tratado com losartan (n=9). Dados expressos em média $\pm$ desvio-padrão. Análise de variância (ANOVA), complementada com teste de Tukey. *p<0,05 vs. C; # p <0,05 vs. Ob; & p<0,05 vs. C+Los.

DISCUSSÃO

A obesidade tem sido amplamente estudada em modelos experimentais, com o intuito de identificar os mecanismos responsáveis pelas alterações estrutural, molecular, metabólica e funcional cardíaca^(73,80,85,86). Partindo da hipótese inicial de que a obesidade se associa a inúmeros distúrbios modulados pelo sistema renina angiotensina (SRA)^(10,11,14,16-18,21,22), a proposta do presente trabalho foi investigar se a obesidade, por dieta hiperlipídica saturada, aumenta os colágenos I e III cardíaco via ativação do receptor AT1 do sistema SRA.

Dietas hipercalóricas, ricas em lipídeos e carboidratos, têm sido frequentemente utilizadas para a indução de obesidade em roedores⁽⁸⁷⁻⁸⁹⁾ por compartilharem padrões similares aos humanos obesos⁽⁹⁰⁻⁹³⁾. Desde que os ácidos graxos saturados aumentam o risco de doença arterial coronariana^(58,60), induz a apoptose⁽⁶¹⁻⁶⁵⁾, hipertrofia cardíaca^(66,67) e alteração na área e no volume nuclear do miócito⁽⁵⁹⁾, nesse estudo, o aumento da disponibilidade energética foi originada pelo alto teor desse tipo de lipídeo. No sentido de verificar se as alterações encontradas neste trabalho, seriam provenientes somente do excesso de gordura, a quantidade de hidrato de carbono foi semelhante em ambas dietas. Em concordância com outros autores^(76,80,93), a dieta utilizada foi eficiente para induzir a obesidade, denunciada pelo aumento do peso corporal (17%) e do índice de adiposidade (86%).

O consumo de dietas altamente palatáveis, ricas em gorduras e açúcares, promove o aumento de peso corporal por ingestão compulsiva^(94,95); contrapondo-se a essa evidência os ratos dos grupos obeso, apresentaram uma ingestão alimentar menor em relação ao controle, corroborando com outros autores⁽⁹⁶⁻⁹⁸⁾; entretanto, o consumo calórico e a eficiência alimentar foram maiores. Condições com alta ingestão calórica e/ou reduzida demanda energética propiciam o aumento de estoques adipositários⁽⁹⁹⁾; este fato é resultante da relação entre taxa metabólica de repouso, efeito térmico do alimento e demanda imposta pela atividade física⁽¹⁴⁾.

Os lipídeos constituem os macronutrientes de maior densidade energética, com aproximadamente 9 kcal/g, e menor efeito térmico⁽¹⁰⁰⁾, o que resulta em maior conversão em reservas adiposas^(99,100). A administração de losartan não alterou o perfil nutricional neste estudo; este dado está de acordo com Machado et al⁽¹⁰¹⁾, que utilizaram ratos obesos por dieta hiperlipídica saturada por 20 semanas e mais 16 semanas de administração de 10mg/kg/dia de losartan. Alguns autores utilizando ratos obesos por dietas hiperlipídica insaturada⁽⁶⁸⁾, de perfil lipídico desconhecido^(102,103), e de cafeteria⁽¹⁰⁴⁻¹⁰⁶⁾, em diferentes doses de losartan e de períodos experimentais, também não encontraram alterações na avaliação nutricional.

Os animais obesos exibiram inúmeros distúrbios metabólicos e endócrinos, como menor tolerância glicêmica, dislipidemias, resistência à insulina, hiperinsulinemia e hiperleptinemia, cujos mecanismos foram discutidos em trabalhos anteriores^(59,68,107). Esses dados estão em concordância com diferentes modelos de obesidade induzida por dieta^(88,89,107,108-113) e compatíveis com o quadro de síndrome metabólica, correspondente à obesidade humana. A administração de losartan nos grupos Ob e C acarretou diminuição na tolerância glicêmica e nos níveis de insulina. A angiotensina-II, modulador da sinalização insulínica, participa dos mecanismos envolvidos na resistência à ação deste hormônio sobre o metabolismo da glicose, secundários à ativação do receptor AT1⁽¹¹⁴⁻¹¹⁷⁾. No bloqueio farmacológico, pelo losartan, as vias de interação entre angiotensina-II e insulina são atenuadas, acarretando aumento da utilização da glicose pelas células, o que promove queda nos níveis glicêmicos plasmáticos e consequentemente da insulina⁽⁶⁸⁾. A literatura mostra que a administração de losartan, 30 mg/kg/dia, reduziu os índices glicêmicos na obesidade induzida por dieta de cafeteria⁽¹⁰⁴⁾. Entretanto, em doses de 10 mg/kg/dia, esse fármaco decresceu a glicemia, mas não afetou os níveis de insulina na obesidade por dieta hipercalórica⁽¹⁰³⁾. Nas dosagens de 20⁽¹⁰⁵⁾ e 10 mg/kg/dia^(65,103) não foram detectadas alterações nas taxas glicêmicas e de insulina em ratos obesos por dietas de cafeteria e

hiperlipídica saturada, respectivamente. O losartan também diminuiu a secreção de leptina pelo tecido adiposo nos animais obesos, o que não ocorreu no grupo controle, mostrando interação entre o fármaco e a obesidade. Hosseini et al.⁽¹¹⁸⁾ e Umeda et al.⁽⁷⁹⁾ constataram que o bloqueio de AT1 reduziu os níveis séricos de leptina em ratos Wistar alimentados com dieta de cafeteria e em ratos espontaneamente hipertensos obesos por dieta enriquecida de sacarose, respectivamente. Entretanto, Oliveira-Junior et al.⁽⁶⁸⁾, utilizando ratos obesos por dieta insaturada, acrescida de açúcares, mostraram que o losartan não afetou os níveis de leptina.

Embora neste trabalho, não tenha sido visualizada alteração da angiotensina II e da ECA no coração dos animais obesos, houve aumento expressivo do receptor AT1 miocárdico. Em razão de termos encontrado aumento da angiotensina II circulante, acreditamos que não houve necessidade da elevação dessa proteína no miocárdio; entretanto, esse excesso plasmático acarretou aumento na expressão do AT1. Esse comportamento nos permite inferir que há um sinergismo entre o sistema renina angiotensina intrínseco ao miocárdio e o circulante.

É bem conhecido na literatura, o fenômeno de *downregulation* dos receptores em situações de excesso de um agente externo durante longo período, tipificado na situação de insuficiência cardíaca em que os receptores beta-adrenérgicos sofrem esse processo em razão dos altos níveis de catecolaminas circulantes^(119,120). Acreditamos que o aumento da angiotensina II circulante, nos animais obesos, não teve duração e intensidade suficiente para promover o processo de *downregulation* no receptor AT1 miocárdico. Alguns pesquisadores encontraram aumento do receptor na aorta⁽¹²¹⁾ e em arteríolas coronárias⁽¹²²⁾ em modelos de obesidade por dieta hiperlipídica. Em modelos genéticos, Huang et al.⁽¹²³⁾ observaram aumento na expressão proteica do receptor AT1 miocárdico de ratos Zucker diabéticos; entretanto, Barretti et al.⁽²¹⁾ não visualizaram alteração da expressão do receptor cardíaco nesse mesmo modelo experimental.

A administração do losartan acarretou elevação da angiotensina II e da atividade da ECA no miocárdio, porém, no tecido visceral e circulante verificou-se o oposto, ou seja, diminuição dessas proteínas. Os mecanismos envolvidos nessa resposta não estão estabelecidos, desde que não encontramos trabalhos nesta área de pesquisa; uma possível explicação para esta ocorrência seria o comportamento do receptor AT1 miocárdico, que ao sofrer uma redução com o losartan, desencadeou aumento compensatório da angiotensina II e da atividade da ECA miocárdica. Esse fenômeno teve como finalidade manter a homeostasia do sistema renina angiotensina sistêmico, desde que o fármaco promoveu redução significativa na concentração da angiotensina II e na atividade da ECA no tecido adiposo visceral e circulante.

Os dados deste trabalho, mostram que a obesidade promoveu aumento da pressão arterial sistólica (PAS) e como o controle da mesma, envolve a participação do sistema renina-angiotensina⁽¹²⁴⁻¹²⁶⁾, podemos inferir que houve participação desse sistema no comportamento desta variável, desde que neste estudo foi observado aumento da angiotensina II e da ECA circulante e queda significativa da PAS após o bloqueio com losartan. Enquanto alguns estudos não observaram alteração da PAS em animais obesos por dieta hiperlipídica insaturada^(68,86,112), Machado et al⁽¹⁰¹⁾ e outros autores^(92,127) utilizando ratos obesos por dietas hiperlipídica saturada e com equilíbrio de ácidos graxos saturados e insaturados, respectivamente, mostraram aumento dos níveis pressóricos. A diminuição da pressão arterial com a administração do losartan em ratos obesos foi também observada em outros trabalhos experimentais^(101,68,128).

O objetivo maior deste estudo foi avaliar a associação entre o comportamento dos colágenos I e III cardíaco e o sistema renina angiotensina. A obesidade, neste estudo, promoveu aumento na expressão proteica dos colágenos tipo I e tipo III miocárdico; esses dados estão em concordância com investigadores que documentaram aumento nesses

colágenos em diferentes protocolos experimentais de obesidade^(56,129,130) e em desacordo com autores que observaram diminuição do colágeno tipo I em ratos obesos por dieta hiperlipídica insaturada⁽⁴⁸⁾.

O metabolismo do colágeno é resultante do balanço entre síntese e degradação. Os dados deste estudo evidenciaram que a síntese dos colágenos deve ter prevalecido desde que foi constatado que a obesidade promoveu diminuição na atividade da metaloproteinase-2 miocárdica e aumento de citocinas que participam da proliferação do colágeno^(43-47,131-139) como o TGF- β cardíaco e a leptina e angiotensina II circulantes.

A participação da angiotensina II no comportamento do colágeno miocárdico se consolidou com os resultados alcançados, que mostraram que o bloqueio do receptor AT1, pelo losartan, diminuiu significativamente a expressão dos colágenos I e III miocárdico no grupo obeso submetido ao tratamento. Os dados relacionados ao comportamento da angiotensina II no miocárdio e na circulação, referidos acima, mostram que o indutor da alteração dos colágenos não foi o sistema renina angiotensina intrínseco ao miocárdio, mas sim, o excesso da angiotensina II circulante proveniente do aumento da massa adiposa visceral.

Os resultados alcançados neste estudo poderão contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na remodelação cardíaca e prevenção da deterioração da função miocárdica na condição de obesidade.

CONCLUSÃO

A hipótese deste trabalho foi confirmada, desde que a obesidade por dieta hiperlipídica saturada aumenta os colágenos I e III cardíaco, via receptor AT1, consequente à elevação da angiotensina II circulante, proveniente do excesso de secreção pelo tecido adiposo visceral.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Obesity and overweight. Access: 18/02/2016. Available from: <http://www.who.int>
2. Eckel RH, Barouch WW, Ershow AG. Report of the national heart, lung, and blood institute-national of diabetes and digestive and kidney diseases working group on the pathophysiology of obesity-associated cardiovascular disease. *Circulation*. 2002;105(24):2923-28.
3. O' Brien PE, Dixon JB. The extent of the problem of obesity. *Am J Surg*. 2002;184(6B):4S-8S.
4. Wong CY, O' Moore-Sullivan T, Leano R, Byrne N, Beller E, Marwick TH. Alterations of left ventricular myocardial characteristics associated with obesity. *Circulation*. 2004;110(19):3081-87.
5. Fontaine KR, Redden DT, Wang C, Westfall AO, Allison DB. Years of life lost due to obesity. *JAMA*. 2003;289(2):187-93.
6. Wilson PWF, D' Agostino RB, Sullivan L, Parise H, Kannel WB. Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk. *Arch Intern Med*. 2002;162(16):1867-72.
7. Malnick SDH, Knobler H. The medical complications of obesity. *Q J Med*. 2006;99(9):565-79.
8. Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer X, et al. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Circulation*. 2006;113(6):898-18.
9. Lavie CJ, Milani RV, Ventura HO. Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53(21):1925-32.
10. Booth A, Magnuson A, Fouts J, Foster MT. Adipose tissue: an endocrine organ playing a role in metabolic regulation. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2016. [*Epub ahead of print*]
11. Lehr S, Hartwig S, Sell H. Adipokines: a treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *Proteomics Clin Appl*. 2012;6(1-2):91-101.
12. Matsuzawa Y. Adiponectin: a key player in obesity related disorders. *Curr Pharm Des*. 2010;16(17):1896-901.
13. Hall ME, Harmancey R, Stec DE. Lean heart: role of leptin in cardiac hypertrophy and metabolism. *World J Cardiol*. 2015;7(9):511-24.
14. Govindarajan G, Alpert M, Tejwani L. Endocrine and metabolic effects of fat: Cardiovascular implications. *Am J Med*. 2008;121(5):366-70.

15. Mohan SK, Veeraraghavan VP, Jainu M. Effect of pioglitazone, quercetin and hydroxy citric acid on extracellular matrix components in experimentally induced non-alcoholic steatohepatitis. *Iran J Basic Med Sci.* 2015;18(8):832-6.
16. Segura J, Ruilope LM. Obesity, essential hypertension and renin-angiotensin system. *Public Health Nutr.* 2007;10(10A):1151-5.
17. Engeli S, Schling P, Gorzelniak K, Boschmann M, Janke J, Ailhaud G, et al. The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(6):807-25.
18. Klötting N, Blüher M. Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord.* 2014;15(4):277-87.
19. Blüher M. Adipokines - removing road blocks to obesity and diabetes therapy. *Mol Metab.* 2014;3(3):230-40.
20. Blüher M. Clinical relevance of adipokines. *Diabetes Metab J.* 2012;36(5):317-27.
21. Barretti DL, Magalhães FC, Fernandes T, do Carmo EC, Rosa KT, Irigoyen MC, et al. Effects of aerobic exercise training on cardiac renin-angiotensin system in an obese Zucker rat strain. *PLoS One.* 2012;7(10):e46114.
22. Xue B, Yu Y, Zhang Z, Guo F, Beltz TG, Thunhorst RL, et al. Leptin mediates high-fat diet sensitization of angiotensin II- elicited hypertension by upregulating the brain renin-angiotensin system and inflammation. *Hypertension.* 2016;67(5):970-6.
23. Ahmadian E, Jafari S, Yari KA. Role of angiotensin II in stem cell therapy of cardiac disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2015;16(4):702-11.
24. Feng YH, Fu P. Dual blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system in type 2 diabetic kidney disease. *Chin Med J (Engl).* 2016;129(1):81-7.
25. Smith PM, Hindmarch CC, Murphy D, Ferguson AV. AT1 receptor blockade alters nutritional and biometric development in obesity-resistant and obesity-prone rats submitted to a high fat diet. *Front Psychol.* 2014;5(1):832.
26. Giestas A, Palma I, Ramos MH. Renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and its pharmacologic modulation. *Acta Med Port.* 2010;23(4):677-88.
27. Thethi T, Kamiyama M, Kobori H. The link between the renin-angiotensin-aldosterone system and renal injury in obesity and the metabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep.* 2012;14(2):160-9.
28. Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin- angiotensin system revisited. *J Intern Med.* 2008;264(3):224-36.
29. Varagic J, Frohlich ED. Local cardiac renin-angiotensin system: hypertension and cardiac failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34(11):1435-42.

30. Kumar R, Singh VP, Baker KM. The intracellular renin-angiotensin system in the heart. *Curr Hypertens Rep.* 2009;11(2):104-10.
31. Kumar R, Baker KM, Pan J. Activation of the renin-angiotensin system in heart failure. In: Mann DL. *Heart failure: a companion to Braunwald's heart disease.* 2nd ed. Sant Louis: Elsevier. 2011; 134-51.
32. Goossens GH, Jocken JW, Blaak EE, Schiffrers PM, Saris WH, van Baak MA. Endocrine role of the renin-angiotensin system in human adipose tissue and muscle: effect of beta-adrenergic stimulation. *Hypertension.* 2007;49(3):542-7.
33. Komuro I. Molecular mechanism of cardiac hypertrophy and development. *Jpn Circ J.* 2001;65(5):353-8.
34. Danser AH, Schalekamp MA. Is there an internal cardiac renin-angiotensin system? *Heart.* 1996;76(3):28-32.
35. Tomoaia G, Pasca RD. On the Collagen Mineralization. A Review. *Clujul Med.* 2015;88(1):15-22.
36. Wahyudi H, Reynolds AA, Li Y, Owen SC, Yu SM. Targeting collagen for diagnostic imaging and therapeutic delivery. *J Control Release.* 2016. [*Epub ahead of print*]
37. Avilés-Reyes A, Miller JH, Lemos JA, Abranches J. The collagen binding proteins of streptococcus mutans and related streptococci. *Mol Oral Microbiol.* 2016. [*Epub ahead of print*]
38. Horn MA, Trafford AW. Aging and the cardiac collagen matrix: novel mediators of fibrotic remodelling. *J Mol Cell Cardiol.* 2015; 2828(15):30110-3.
39. Lopes JDM, Gomes RAS, Hial V, Lopes ICR, Reis MA, Teixeira VPA. Correlações entre o teor de colágeno no miocárdio ventricular esquerdo humano medido através de métodos bioquímico e morfométrico. *Arq Bras Cardiol.* 2002;79(2):10-4.
40. Matsubara LS, Narikawa S, Ferreira ALA, Paiva SAR, Zornoff LM, Matsubara BB. Remodelação miocárdica na sobrecarga crônica de pressão e volume no coração de ratos. *Arq Bras Cardiol.* 2006;86(2):126-30.
41. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Junções celulares, adesão celular e matriz extracelular. In: Alberts B. *Biologia molecular da célula.* 5th ed. Porto Alegre: Artmed. 2010;1131-204.
42. Guimarães DA, Rizzi E, Ceron CS, Martins-Oliveira A, Gerlach RF, Santos JET. Inhibition of matrix metalloproteinases: a possible therapeutic strategy in arterial hypertension? *Rev Bras Hipertens.* 2010;17(4):226-30.
43. Bader M. Role of the local renin-angiotensin system in cardiac damage: a minireview focussing on transgenic animal models. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34(11):1455-62.

44. Chen J, Mehta JL. Angiotensin II mediated oxidative stress and procollagen-1 expression in cardiac fibroblasts: blockade by pravastatin and pioglitazone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(4):H1738-45.
45. Lijnen PJ, Petrov VV. Role of intracardiac renin-angiotensin-aldosterone system in extracellular matrix remodeling. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2003;25(7):541-64.
46. Neves MF, Amiri F, Virdis A, Diep QN, Schiffrin EL. CIHR multidisciplinary research group on hypertension. Role of aldosterone in angiotensin II-induced cardiac and aortic inflammation, fibrosis, and hypertrophy. *Can J Physiol Pharmacol*. 2005;83(11):999-06.
47. Li WJ, Liu Y, Wang JJ, Zhang YL, Lai S, Xia YL, et al. "Angiotensin II memory" contributes to the development of hypertension and vascular injury via activation of NADPH oxidase. *Life Sci*. 2016;149(1):18-24.
48. Silva DCT, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Campos DH, Nascimento AF, Oliveira Junior SA, et al. Influence of term of exposure to high-fat diet-induced obesity on myocardial collagen type I and III. *Arq Bras Cardiol*. 2014;102(2):157-63.
49. Guglielmi V, Cardellini M, Cinti F, Corgosinho F, Cardolini I, D'Adamo M, et al. Omental adipose tissue fibrosis and insulin resistance in severe obesity. *Nutr Diabetes*. 2015;5(1):e175.
50. Adapala VJ, Adedokun SA, Considine RV, Ajuwon KM. Acute inflammation plays a limited role in the regulation of adipose tissue COL1A1 protein abundance. *J Nutr Biochem*. 2012;23(6):567-72.
51. Nie J, Bradshaw AD, Delany AM, Sage EH. Inactivation of SPARC enhances high-fat diet-induced obesity in mice. *Connect Tissue Res*. 2011;52(2):99-08.
52. Patsch JM, Kiefer FW, Varga P, Pail P, Rauner M, Stupphann D, et al. Increased bone resorption and impaired bone microarchitecture in short-term and extended high-fat diet-induced obesity. *Metabolism*. 2011;60(2):243-9.
53. Lo L, McLennan SV, Williams PF, Bonner J, Chowdhury S, McCaughan GW, et al. Diabetes is a progression factor for hepatic fibrosis in a high fat fed mouse obesity model of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2011;55(2):435-44.
54. Szczęsny W, Szczepanek J, Tretyn A, Dąbrowiecki S, Szmytkowski J, Polak J. An analysis of the expression of collagen I and III genes in the fascia of obese patients. *J Surg Res*. 2015;195(2):475-80.
55. Lancha A, Rodríguez A, Catalán V, Becerril S, Sáinz N, Ramírez B et al. Osteopontin deletion prevents the development of obesity and hepatic steatosis via impaired adipose tissue matrix remodeling and reduced inflammation and fibrosis in adipose tissue and liver in mice. *PLoS One*. 2014;9(5):e98398.
56. Martínez- Martínez E, Miana M, Jurado-López R, Rousseau E, Rossignol P, Zannad F, et al. A role for soluble ST2 in vascular remodeling associated with obesity in rats. *PLoS One*. 2013;8(11):e79176.

57. Minullina IR, Alexeyeva NP, Anisimov SV, Puzanov MV, Kozlova SN, Sviryayev YV, et al. Transcriptional changes in bone marrow stromal cells of patients with heart failure. *Cell Cycle*. 2014;13(9):1495-500.
58. De Lorgeril M, Salen P. New insights into the health effects of dietary saturated and omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids. *BMC Medicine*. 2012;10(1):50.
59. Oliveira Junior SA, Padovani CR, Rodrigues SA, Silva NR, Martinez PF, Campos DH, et al. Extensive impact of saturated fatty acids on metabolic and cardiovascular profile in rats with diet-induced obesity: a canonical analysis. *Cardiovasc Diabetol*. 2013;12(1):65.
60. German JB, Dillard CJ. Saturated fats: what dietary intake? *Am J Clin Nutr*. 2004;80(3):550-9.
61. Dyntar D, Eppenberger-Eberhardt M, Maedler K, Pruschy M, Eppenberger HM, Spinass GA, et al. Glucose and palmitic acid induce degeneration of myofibrils and modulate apoptosis in rat adult cardiomyocytes. *Diabetes*. 2001;50(9):2105-13.
62. De Vries JE, Vork MM, Roemen TH, de Jong YF, Cleutjens JP, van der Vusse GJ, et al. Saturated but not mono-unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in neonatal rat ventricular myocytes. *J Lipid Res*. 1997;38(7):1384-94.
63. Sparagna GC, Hickson-Bick DL, Buja LM, McMillin JB. A metabolic role for mitochondria in palmitate-induced cardiac myocyte apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279(5):H2124-32.
64. Hickson-Bick DL, Buja LM, McMillin JB. Palmitate-mediated alterations in the fatty acid metabolism of rat neonatal cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32(3):511-9.
65. Hickson-Bick DL, Sparagna GC, Buja LM, McMillin JB. Palmitate-induced apoptosis in neonatal cardiomyocytes is not dependent on the generation of ROS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;282(2):H656-64.
66. Jeckel KM, Miller KE, Chicco AJ, Chapman PL, Mulligan CM, Falcone PH, et al. The role of dietary fatty acids in predicting myocardial structure in fat-fed rats. *Lipids Health Dis*. 2011;10(1):92.
67. Jalili T, Manning J, Kim S. Increased translocation of cardiac protein kinase C beta2 accompanies mild cardiac hypertrophy in rats fed saturated fat. *J Nutr*. 2003;133(2):358-61.
68. Oliveira-Junior SA, Martinez PF, Guizoni DM, Campos DH, Fernandes T, Oliveira EM, et al. AT1 receptor blockade attenuates insulin resistance and myocardial remodeling in rats with diet-induced obesity. *PLoS One*. 2014; 23;9(1):e86447.
69. Dostal DE. The cardiac renin-angiotensin system: novel signaling mechanisms related to cardiac growth and function. *Regul Pept*. 2000;91(1-3):1-11.

70. Committee on Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the care and use of laboratory animals. Bethesda: National Institute of Health; 1985.
71. Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Luvizotto RAM, Nogueira CR, et al. A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and co-morbidities in wistar rats. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008;52(6):968–74.
72. Levin BE, Richard D, Michel C, Servatius R. Differential stress responsivity in diet-induced obese and resistant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000;279(4):R1357–64.
73. Carroll JF, Zenebe WJ, Strange TB. Cardiovascular function in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension*. 2006;48(1):65–72.
74. Boustany-Kari CM, Gong M, Akers WS, Guo Z, Cassis LA. Enhanced vascular contractility and diminished coronary artery flow in rats made hypertensive from diet-induced obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2007;31(11):1652–9.
75. Dobrian AD, Davies MJ, Prewitt RL, Lauterio TJ. Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension*. 2000;35(4):1009–15.
76. Akiyama T, Tachibana I, Shirohara H, Watanabe N, Otsuki M. High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. *Diabetes Res Clin Pract*. 1996;31(1-3):27–35.
77. Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, Tso P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr*. 2003;133(4):1081–7.
78. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412-9.
79. 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.
80. Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Silva DCT, Nascimento AF, Campos DHS, Luvizotto RAM, et al. Long-term obesity promotes alterations in diastolic function induced by reduction of phospholamban phosphorylation at serine-16 without affecting calcium handling. *J Appl Physiol*. 2014;117(6):669–78.
81. 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.
82. Tyagi SC, Matsubara L, Weber KT. Direct extraction and estimation of collagenase(s) activity by zymography in microquantities of rat myocardium and uterus. *Clin Biochem*. 1993;26(3):191–8.

83. Johnson RA, Wichern DW. Applied multivariate statistical analysis. New Jersey; Prefice-Hall. 1998;4:816.
84. Norman GR, Streiner DI. Biostatistics: the bare essentials. St. Louis (Mosby) 1994.
85. Abdurrachim D, Ciapaite J, Wessels B, Nabben M, Luiken JJFP, Nicolay K, et al. Cardiac diastolic dysfunction in high-fat diet fed mice is associated with lipotoxicity without impairment of cardiac energetics in vivo. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(10):1525–37.
86. 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.
87. Lopaschuk GD, Folmes CD, Stanley WC. Cardiac energy metabolism in obesity. *Circ Res*. 2007;101(4):335-47.
88. Lima-Leopoldo AP, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Carvalho RF, Nogueira CR, Nascimento AF, et al. Obesity induces upregulation of genes involved in myocardial Ca²⁺ handling. *Braz J Med Biol Res*. 2008;41(7):615-20.
89. Wilson C, Tran M, Salazar K, Young M, Taegtmeier 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.
90. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)*. 2007;15(4):798-08.
91. Li S, Zhang H-Y, Hu CC, Lawrence F, Gallagher KE, Surapaneni A, et al. Assessment of diet-induced obese rats as an obesity model by comparative functional genomics. *Obesity (Silver Spring)*. 2008;16(4):811–8.
92. Reuter TY. Diet-induced models for obesity and type 2 diabetes. *DrugDiscov Today Dis Model*. 2007;4(1):3–8.
93. Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz- Schughart LA, Schölmerich J, et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol*. 2006;36(3):485–01.
94. Erlanson-Albertsson C. How palatable food disrupts appetite regulation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2005;97(2):61–73.
95. Sclafani A. Oral and postoral determinants of food reward. *Physiol Behav*. 2004;81(5):773–9.
96. Freire PP, Alves CAB, Deus AF, Leopoldo APL, Leopoldo AS, Silva DCT, et al. Obesity does not lead to imbalance between myocardial phospholamban phosphorylation and dephosphorylation. *Arq Bras Cardiol*. 2014;24(17):1639–41.

97. Higa TS, Spinola AV, Fonseca-Alaniz MH, Evangelista FSA. Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2014;6(1):47–54.
98. Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freemerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)*. 2011;19(6):1109–17.
99. 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.
100. Flatt J. Carbohydrate balance and food-intake regulation. *Am J Clin Nutr*. 1995;62(1):155-6.
101. Machado H, Pinheiro HS, Terra MM, Guerra MO, Paula RB, Peters VM. Dissociation of antihypertensive and metabolic response to losartan and spironolactone in experimental rats with metabolic syndrome. *J Bras Nefrol*. 2012;34(4):328-36.
102. 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.
103. 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.
104. 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.
105. 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.
106. Miesel A, Müller-Fielitz H, Jöhren O, Vogt FM, Raasch WBr. Double blockade of angiotensin II (AT(1))-receptors and ACE does not improve weight gain and glucose homeostasis better than single-drug treatments in obese rats. *J Pharmacol*. 2012;165(8):2721-35.
107. Oliveira- Junior 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.
108. 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):208-17.

109. 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):367-73.
110. 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.
111. Paulino EC, Ferreira JCB, Bechara LR, Tsutsui JM, Mathias Jr W, Lima FB, et al. Exercise training and caloric restriction prevent reduction in cardiac Ca²⁺-handling protein profile in obese rats. *Hypertension.* 2010;56(4):629-35.
112. 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.
113. Pinheiro A, Cunha A, Aguila M, Mandarim-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.
114. Cooper S, Whaley-Connell A, Habibi J, Wei Y, Lastra G, Manrique C, et al. Reninangiotensin- aldosterone system and oxidative stress in cardiovascular insulin resistance. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 2007;293(4):2009-23.
115. 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.
116. 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.
117. 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):195-03.
118. Sharieh-Hosseini SG, KhatamsazS, Shariati M. The effects of losartan on memory performance and leptin resistance induced by obesity and high-fat diet in adult male rats. *Iran J Basic Med Sci.* 2014;17(1):41-8
119. Teng JK, Kwan CM, Lin LJ, Tsai LM, Cheng JT, Chang WC, et al. Down-regulation of beta-adrenergic receptors on mononuclear leukocytes induced by dobutamine treatment in patients with congestive heart failure. *Eur Heart J.* 1993;14(10):1349-53.
120. Lindenfeld J, Cleveland JCJr, Kao DP, White M, Wichman S, Bristow JC, et al. Sex-related differences in age-associated downregulation of human ventricular myocardial β 1-adrenergic receptors. *J Heart Lung Transplant.* 2016;35(3):352-61.

121. Touati S, Montezano AC, Meziri F, Riva C, Touyz RM, Laurant P. Exercise training protects against atherosclerotic risk factors through vascular NADPH oxidase, extracellular signal-regulated kinase 1/2 and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase downregulation in obese rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2015;42(2):179-85.
122. Zhang C, Knudson JD, Setty S, Araiza A, Dincer UD, Kuo L, et al. Coronary arteriolar vasoconstriction to angiotensin II is augmented in prediabetic metabolic syndrome via activation of AT1 receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(5):2154-62.
123. Huang TH, He L, Qin Q, Yang Q, Peng G, Harada M, et al. Salacia oblonga root decreases cardiac hypertrophy in Zucker diabetic fatty rats: inhibition of cardiac expression of angiotensin II type 1 receptor. *Diabetes Obes Metab*. 2008;10(7):574-85.
124. Dincer UD, Araiza A, Knudson JD, Shao CH, Bidasee KR, Tune JD. Dysfunction of cardiac ryanodine receptors in the metabolic syndrome. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;41:108-14.
125. Srinivasan SR, Bao W, Wattigney WA, Berenson GS. Adolescent overweight is associated with adult overweight and related multiple cardiovascular risk factors: the Bogalusa Heart Study. *Metabolism*. 1996;45:235-40.
126. Scaglione R, Dichiaro MA, Indovina A, Lipari R, Ganguzza A, Parrinello G, et al. Left ventricular diastolic and systolic function in normotensive obese subjects: influence of degree and duration of obesity. *Eur Heart J*. 1992;13(6):738-42.
127. Fitzgerald SM, Henegar JR, Brands MW, Henegar LK, Hall JE. Cardiovascular and renal responses to a high-fat diet in Osborne-Mendel rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001;281(2):R547-52.
128. Gupta M, Thatcher SE, Boustany-Kari CM, Shoemaker R, Yiannikouris F, Zhang X, et al. Angiotensin converting enzyme 2 contributes to sex differences in the development of obesity hypertension in C57BL/6 mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(6):1392-9.
129. Carroll JF, Tyagi SC. Extracellular matrix remodeling in the heart of the homocysteinemic obese rabbits. *Am J Hypertens* 2005;18(5):692-8.
130. Martínez-Martínez E, Jurado-López R, Valero-Muñoz M, Bartolomé MV, Ballesteros S, Luaces M, et al. Leptin induces cardiac fibrosis through galectin-3, mTOR and oxidative stress: potential role in obesity. *J Hypertens*. 2014;32(5):1104-14.
131. Booz GW, Baker KM. Molecular signaling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblast. *London Cardiovasc Res*. 1995;30(4):537-43.
132. Wylie-Sears J, Levine RA, Bischoff J. Losartan inhibits endothelial-to-mesenchymal transformation in mitral valve endothelial cells by blocking transforming growth factor- β -induced phosphorylation of ERK. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;446(4):870-5.

133. Gelsea K, Poesschl E, Aigner T. Collagens: structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2003;55(12):1531-46.
134. Zhang Y, Stefanovic B. LARP6 Meets collagen mRNA: specific regulation of type I collagen expression. *Int J Mol Sci*. 2016;17(3):E419.
135. Schram K, De Girolamo S, Madani S, Munoz D, Thong F, Sweeney G. Leptin regulates MMP-2, TIMP-1 and collagen synthesis via p38 MAPK in HL-1 murine cardiomyocytes. *Cell Mol Biol Lett*. 2010;15(4):551-63.
136. Schram K, Wong MM, Palanivel R, No EK, Dixon IM, Sweeney G. Increased expression and cell surface localization of MT1-MMP plays a role in stimulation of MMP-2 activity by leptin in neonatal rat cardiac myofibroblasts. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;44(5):874-81.
137. Madani S, De Girolamo S, Muñoz DM, Li RK, Sweeney G. Direct effects of leptin on size and extracellular matrix components of human pediatric ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*. 2006; 69(3):716-25.
138. Schram K, Ganguly R, No EK, Fang X, Thong FS, Sweeney G. Regulation of MT1-MMP and MMP-2 by leptin in cardiac fibroblasts involves Rho/ROCK-dependent actin cytoskeletal reorganization and leads to enhanced cell migration. *Endocrinology*. 2011;152(5):2037-47.
139. Tao M, Yu P, Nguyen BT, Mizrahi B, Savion N, Kolodgie FD, et al. Locally applied leptin induces regional aortic wall degeneration preceding aneurysm formation in apolipoprotein e-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(2):311-20.

Anexo 1 – Perfil de ácidos graxos (%) das dietas normolipídicas e hiperlipídicas.**Quadro 1-** Perfil de ácidos graxos (%).

Ácidos graxos	Rações	
	Normolipídica	Hiperlipídica
Capróico (c6:0)	0,11	0,13
Caprílico (c8:0)	1,99	2,18
Cáprico (c10:0)	2,12	2,32
Undecanoico (c11:0)	0,02	0,02
Láurico (c12:0)	30,81	33,73
Tridecanoico (c13:0)	0,04	0,04
Mirístico (c14:0)	11,06	12,10
Pentadecanoico (c15:0)	0,01	0,00
Palmítico (c16:0)	11,95	11,18
Heptadecanóico (c17:0)	0,04	0,02
Estearico (c18:0)	2,89	2,66
Araquídico (c20:0)	0,24	0,22
Behênico (c22:0)	0,12	0,12
Tricosanóico (c23:0)	0,02	0,01
Lignocérico (c24:0)	0,08	0,07
Palmitoléico (c16:1)	0,04	0,02
Heptadecenoico (c17:1)	0,02	0,01
Oléico (c18:1n7)	19,48	20,71
Cis-vacênico (c18:1n7)	0,49	0,33
Linoléico (c18:2n6)	16,69	12,95
α-Linolênico (c18:3n3)	1,67	1,05
Eicosanoico (c20:1n7)	0,10	0,11
Ácidos Graxos Saturados	61,52	64,81
Ácidos Graxos Insaturados	38,48	35,19