



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISILOGIA

MARCELO AURELIO DA ROCHA

**IMPLICAÇÕES CARDIOVASCULARES E METABÓLICAS DA INIBIÇÃO DO
SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA EM RATOS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS ALIMENTADOS COM UMA DIETA HIPERLIPÍDICA**

Recife

2018

MARCELO AURELIO DA ROCHA

**IMPLICAÇÕES CARDIOMETABÓLICAS DA INIBIÇÃO DO SISTEMA RENINA
ANGIOTENSINA EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS
ALIMENTADOS COM UMA DIETA HIPERLIPÍDICA**

Tese apresentada ao programa de pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia.

Área de Concentração: Bioquímica e Fisiologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Glória Isolina Boente Pinto Duarte

Coorientadora: Prof^a. Dra^a. Dayane Aparecida Gomes

Recife

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Rocha, Marcelo Aurelio da

Implicações cardiometabólicas da inibição do sistema renina
angiotensina em ratos espontaneamente hipertensos alimentados
com uma dieta hiperlipídica / Marcelo Aurelio da Rocha - 2018.

95 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Glória Isolina Boente Pinto Duarte

Coorientadora: Dayane Aparecida Gomes

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e
Fisiologia. Recife, 2018.

Inclui referências.

1. Enalapril 2. Obesidade 3. Função cardiovascular

I. Duarte, Glória Isolina Boente Pinto (orient.) II. Gomes, Dayane
Aparecida (coorient.) III. Título

613.2

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-246

MARCELO AURELIO DA ROCHA

**IMPLICAÇÕES CARDIOMETABÓLICAS DA INIBIÇÃO DO SISTEMA RENINA
ANGIOTENSINA EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS
ALIMENTADOS COM UMA DIETA HIPERLIPÍDICA**

Tese apresentada ao programa de pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia.

Aprovada em: 24/09/2018.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Glória Isolina Boente Pinto Duarte (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Eduardo Carvalho Lira (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Fabiano Elias Xavier (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Mohammed Saad Lahlou (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Pro^a. Dr^a. Valéria Nunes de Souza (Examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esse trabalho à Deus, pois sem ele nada seria possível; Aos meus pais pela dedicação e amor incondicional e a minha esposa pelo apoio e por sempre compreender as minhas ausências.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Glória Isolina Boente Pinto Duarte pelos conselhos, orientação, companheirismo e por me fazer despertar o amor pela pesquisa científica;

À professora Dra. Dayane Aparecida Gomes por aceitar a tarefa de me co-orientar;

Aos companheiros que fizeram ou fazem parte do Laboratórios de Fisiologia Farmacologia Cardiovascular (LFFCV) e Laboratório de Reatividade Vascular (LRV): Brydja Denko, Diego Queiroz, Fabiano Ferreira, Fernanda Elizabeth Ramos, Francine Iane, Geórgia Félix, Geórgia Leal, Hicla Stefane, Ivson Silva, José Jairo Teixeira, Juliana Rocha Alves, Leonardo Gomes, Luciana Veloso, Luis Otavio, Odair Silva e Thayane Rebeca Alves pela ajuda e força;

Aos professores Drs. Cristina Oliveira Silva, Fabiano Elias Xavier, Valéria Nunes de Souza, Mohamed Saad Lahlou;

Aos amigos e técnicos de laboratório Danielle Dutra, Filipe Santos Barbosa, José Antônio Albuquerque, Nielson Torres, Thais Almeida, a veterinária Claudia Oliveira, ao secretário de pós-graduação Djalma Silva, ao amigo Edvaldo Mendes e ao funcionário responsável pela limpeza Hilde.

A todos os professores e amigos da Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE - APQ-1133-2.07/12 Edital Multiusuário), cujo apoio financeiro foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

“A verdadeira coragem é ir atrás de seus sonhos mesmo quando todos dizem que ele é impossível.”

(CORALINA, 1965)

RESUMO

A hipertensão arterial é frequentemente associada à dislipidemias, obesidade e diabetes, fatores que contribuem para o aumento da mortalidade por doenças cardiovasculares (DCV), através da exacerbação de mecanismos que incluem o sistema renina angiotensina (SRA) e o sistema nervoso simpático. Considerando que o SRA, expresso em vários tecidos, está envolvido na modulação do tecido adiposo e no desenvolvimento da hipertensão arterial, nós hipotetizamos que a inibição deste sistema em fases precoces da vida, poderia impedir a reprogramação fetal, diminuindo a susceptibilidade às alterações cardiovasculares e metabólicas. Portanto, para testar esta hipótese, 72 ratos espontaneamente hipertensos (SHR) foram divididos aleatoriamente, no primeiro dia após o desmame em: **a)** grupo Controle - alimentados com dieta padrão (14% de lipídios e 63% de carboidratos), que receberam salina v.o.; **b)** grupo C + E - alimentados com dieta padrão, tratados com enalapril (20 mg/kg, v.o.), **c)** grupo DH - alimentados com uma dieta rica em lipídios/baixa em carboidratos (58,4% de lipídios e 26,6% de carboidratos), que receberam salina v.o.; **d)** grupo DH + E - alimentados com a DH e tratados com enalapril (20 mg/kg, v.o.); Durante todo o tratamento, a ingestão calórica e a massa corporal foram acompanhadas. Estes animais foram subdivididos para realização de diferentes protocolos experimentais: as 12 semanas de idade, foram mensurados a pressão arterial (PA), frequência cardíaca (FC) nos animais não anestesiados, bem como os testes bioquímicos rotineiros (glicemia, níveis de triglicérides e de colesterol, tolerância à glicose e a insulina). Os animais foram eutanasiados para realização dos protocolos utilizando preparações isoladas (artéria aorta), coração isolado. Ainda, foi analisado expressão gênica do peptídeo atrial natriurético e do peptídeo natriurético cerebral, expressão proteica de cicloxigenases 1 e 2 e foram determinados os níveis de ácido graxos não esterificados (NEFA) e leptina. Nossos resultados mostraram que a DH, mesmo com baixo teor de carboidratos, é obesogênica causando intolerância à glicose, resistência à insulina (RI) e piora do quadro de hipertensão arterial e suas consequências. O tratamento precoce com enalapril preveniu o desenvolvimento da obesidade e o aumento dos níveis de leptina, atenuou a pressão arterial sistólica (em cerca de 40 mmHg) e a hipertrofia cardíaca, que foi confirmada pela redução do peptídeo atrial natriurético e peptídeo atrial cerebral. Ademais, melhorou a pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE)

e da dp/dT máxima em resposta a concentrações crescentes de Isoproterenol (10^{-12} a 10^{-4} M), indicando uma melhora no desempenho cardíaco. Houve uma melhora no quadro de disfunção vascular, característica de SHRs. Tomados juntos, os resultados deste estudo sugerem que a utilização do enalapril desde a fase pré-hipertensiva, em SHRs, é capaz de prevenir a programação de grande parte dos efeitos deletérios causados pela hipertensão arterial, mesmo quando associada à obesidade.

Palavras-chave: Enalapril. Obesidade. Função Cardiovascular. Hipertensão Arterial. Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR).

ABSTRACT

Hypertension associated with dyslipidemia, obesity and diabetes are factors that contribute to the increase of mortality due to cardiovascular diseases (CVD) through the exacerbation of mechanisms that include the renin angiotensin system (RAS) and the sympathetic nervous system. The RAS is expressed in various tissues and is involved in the modulation of adipose tissue and the state of arterial hypertension, we hypothesized the inhibition of the system in the early stages of life could prevent a fetal reprogramming by reducing cardiac and metabolic alterations. Therefore, to test this hypothesis, 72 spontaneously hypertensive rats (SHR) were randomly divided on the first day after weaning in: a) Control group - fed with standard diet (14% lipids and 63% carbohydrates), which received v.o. saline; b) C + E group – fed with standard, treated with enalapril (20 mg / kg, v.o.); c) DH group - fed with a diet rich in lipids / low in carbohydrates (58.4% of lipids and 26.6% of carbohydrates), which received saline v.o.; d) DH + E group - fed with DH and treated with enalapril (20 mg / kg, v.o.); Throughout the treatment calorie and body mass were accompanied. At 12 weeks of age, blood pressure (BP) and heart rate (HR) were measured in non-anesthetized animals, as well as routine biochemical tests (blood glucose, triglyceride levels and cholesterol, glucose tolerance, and insulin), as well as blood levels and triglyceride levels and glucose and insulin tolerance. The animals were euthanized to perform the protocols using isolated preparations (aortic artery) and isolated heart. Furthermore, gene expression of the natriuretic atrial peptide and brain natriuretic peptide, protein expression of cyclooxygenase 1 and 2 were also analyzed and the levels of non-esterified fatty acids (NEFA) and leptina was mensured. Our results showed that HD, even with low carbohydrate content, is obese due to glucose intolerance, insulin resistance (IR) and worsening of hypertension and its consequences. Early treatment with enalapril prevented the development of obesity and increased leptin levels, attenuated systolic blood pressure (by about 40 mm Hg) and cardiac hypertrophy, which was confirmed by the reduction of atrial natriuretic peptide and cerebral atrial peptide. In addition, it improved left ventricular systolic pressure (PSVE) and maximal dp / dT in response to increasing concentrations of Isoproterenol (10^{-12} to 10^{-4} M), indicating an improvement in cardiac performance. There was an improvement in vascular dysfunction, characteristic of SHRs. Taken together, the results of this study suggest that the use of enalapril from the prehypertensive phase in SHRs is able to

prevent the programming of most of the deleterious effects caused by arterial hypertension, even when associated with obesity.

Keywords: Enalapril. Obesity. Cardiovascular Function. Arterial Hypertension. Spontaneously Hypertensive Rats (SHR).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Sistema renina - angiotensina. Vias envolvidas na geração de peptídeos ativos Ang-(1–9), Ang II, Ang-(1–7), seus respectivos derivados Ala1-Ang II e alamandine [Ala1-Ang-(1–7).....	37
Figura 2 –	Principais vias de sinalização do receptor para angiotensina 2.....	38
Figura 3 –	Papel do sistema renina angiotensina na geração de espécies reativas de oxigênio no coração.....	39
Figura 4 –	Esquema do delineamento experimental.....	44
Figura 5 –	Aparelho de Langendorff.....	52
Figura 6 –	Representação gráfica do protocolo experimental para avaliação do relaxamento e contração vascular.....	54
Figura 7 –	Representação gráfica da incubação das artérias com indometacina.....	55
Figura 8 –	Efeito do uso de enalapril desde o desmame até 12 semanas de idade sobre o consumo dietético em gramas (A) e em calorias (B) de ratos espontaneamente hipertensos (SHR)	57
Figura 9 –	Efeito do uso de enalapril desde o desmame até 12 semanas de idade sobre a evolução da massa corporal de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) alimentados com dieta hiperlipídica.....	57
Figura 10 –	Efeitos do tratamento precoce com enalapril sobre a relação massa corporal/comprimento da tíbia (A), a relação gordura epididímal/comprimento da tíbia (B) e relação gordura perirrenal/comprimento da tíbia (C), índice de adiposidade (D) de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) alimentados com dieta hiperlipídica durante 12 semanas.....	58
Figura 11 –	Efeitos do tratamento precoce com enalapril sobre o perfil glicêmico e lipídico de ratos espontaneamente hipertensos alimentados com dieta hiperlipídica (DH).....	60
Figura 12 –	Efeitos do tratamento precoce com enalapril sobre o teste oral de tolerância a glicose (TTG - A) e a insulina (TTI - B). C e D representam as respectivas áreas sob a curva. O painel E representa o KITT para insulina.....	61
Figura 13 –	Efeitos do tratamento precoce com enalapril sobre os níveis plasmáticos de ácidos graxos livres (A) e leptina (B) em ratos	

	espontaneamente hipertensos alimentados com dieta hiperlipídica durante 12 semanas.....	62
Figura 14 –	Efeitos do tratamento precoce com enalapril sobre o perfil lipídico hepático de ratos espontaneamente hipertensos que receberam dieta hiperlipídica, durante 12 semanas	63
Figura 15 –	Efeitos do tratamento precoce com enalapril sobre a produção de espécies reativas de oxigênio e nitritos no coração oriundo de ratos espontaneamente hipertensos que receberam dieta hiperlipídica durante 12 semanas	64
Figura 16 –	Efeitos do tratamento precoce com enalapril sobre os níveis cardíacos da superóxido dismutase (SOD, painel A), catalase (painel B) e a relação entre glutatona reduzida e oxidada (GSG/GSSG; painel C) em ratos espontaneamente hipertensos alimentados com dieta hiperlipídica (DH), durante 12 semanas.....	65
Figura 17 –	Efeitos do tratamento precoce com enalapril sobre a expressão proteica do da ciclooxygenase 1 (A), análise proteica da ciclooxygenase 2 (B) e do NOX-4 no ventrículo esquerdo do coração de ratos espontaneamente hipertensos com 12 semanas de idade (C)	66
Figura 18 –	Relação massa corporal/comprimento da tíbia (A). Relação peso do coração úmido (PCU)/peso corporal (B) e relação peso do rim esquerdo/ comprimento da tíbia (C), relação peso do rim direito/comprimento da tíbia (D)	68
Figura 19 –	Efeitos do tratamento precoce com enalapril sobre a expressão gênica do peptídeo atrial natriurético (ANP) (A) e expressão gênica do peptídeo natriurético cerebral (BNP) no ventrículo esquerdo do coração de ratos espontaneamente hipertensos alimentados com dieta hiperlipídica durante 12 semanas	69
Figura 20 –	Variação máxima da pressão ventricular esquerda, dp/dTmax, dp/dT min e frequência cardíaca (FC) em corações isolados de SHR em resposta ao agonista isoproterenol	70
Figura 21 –	Variação da frequência cardíaca (FC) em corações isolados de SHR em resposta ao agonista isoproterenol	71
Figura 22 –	Efeito do tratamento com enalapril no relaxamento dependente de endotélio em anéis de artéria aorta torácica de ratos SHR.....	73

Figura 23 –	Efeito do tratamento com enalapril sobre resposta contrátil em anéis de artéria aorta torácica de ratos SHR.	74
-------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	ácido araquidônico
ADH	Hormônio antidiurético
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
AMR	Artéria mesentérica de resistência
ANF	Fator natriurético atrial
ANG I	Angiotensina 1
ANG II	Angiotensina 2
ANG III	Angiotensina 3
ANG IV	Angiotensina 4
ANG 1-7	Angiotensina 1-7
ANOVA	Análise de variância
ANP	Peptídeo atrial natriurético
AT1 R	Receptor para angiotensina do tipo 1
AT2 R	Receptor para angiotensina do tipo 2
AVP	Arginina vasopressina
BNP	Peptídeo natriurético tipo B
b.p.m.	Batimento por minuto
CAT	Enzima catalase
Chow	Dieta padrão/ controle
cNOS	Óxido nítrico sintase cerebral
COX 1	Ciclooxigenase 1

COX 2	Ciclooxigenase 2
DC	Débito cardíaco
DCV	Doença cardiovascular
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DE	Disfunção endotelial
DM 2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DH	Dieta hiperlipídica
DH+E	Dieta hiperlipídica associada a enalapril
dp/dT_{max}	Primeira derivada temporal da pressão ventricular esquerda máxima
dp/dT_{min}	Derivada temporal da pressão diastólica no ventrículo esquerdo
ECA 1	Enzima conversora de angiotensina 1
ECA 2	Enzima conversora de angiotensina 2
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FC	Frequência cardíaca
GLUT 4	Transportador de glicose tipo 4
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GSH	Enzima glutatona
GTP	Guanosina trifosfato
HA	Hipertensão arterial
HDL-c	Colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidade

HEMEOX1	Hemeoxigenase 1
HEMEOX2	Hemeoxigenase 2
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IDF	Federação Internacional de Diabetes
IECA	Inibidor de enzima de conversão da angiotensina
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
INDO	Indometacina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
i.p.	Intraperitoneal
IP3	Trifosfato de inositol
IP3K	Trifosfato de inositol quinase
ISSO	Isoproterenol
LDLc	Colesterol ligado a lipoproteínas de baixa densidade
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MCP1	Proteína de quimioatração de monócitos 1
MLCK	Miosina quinase de cadeia leve
NA	Noradrenalina
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina peroxidase
NEFA	Ácidos graxos não esterificados
NFκB	Fator nuclear kappa B
NOX 4	Isoforma 4 da NADPH
NPS	Nitroprussiato de Sódio

OMS	Organização Mundial de Saúde
ON	Óxido nítrico
$O_2^{\cdot -}$	Radical superóxido
$ONOO^{\cdot -}$	Radical Peroxinitrito
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PCR	Proteína C reativa
PLC	Fosfolipase C
PGE_2	Prostaglandina E2
$PGE_{2\alpha}$	Prostagladina E2 alfa
PGI_2	Prostaciclina 2
PIP2	Fosfatidil inositol 4,5 bifosfato
PSVE	Pressão sistólica no ventrículo esquerdo
RI	Resistência à insulina
RPT	Resistência periférica total
RS	Retículo sarcoplasmático
SERCA	Cálcio-ATPase do retículo sarcoplasmático
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SNC	Sistema nervoso central
SM	Síndrome metabólica
SNS	Sistema nervoso simpático
SOD	Superóxido dismutase
SRA	Sistema renina angiotensina

SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
SUS	Sistema Único de Saúde
TBARs	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF	Fator de necrose tumoral
TxA2	Tromboxano A2
VCAM -1	Proteína de adesão celular vascular-1
v.o.	Via oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	MODELOS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL E OBESIDADE.....	29
2.2	DISFUNÇÃO ENDOTELIAL	31
2.3	SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA	34
2.4	INIBIDORES DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA.....	40
3	OBJETIVOS	42
3.1	GERAL	42
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	ANIMAIS	43
4.2	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	43
4.3	OBTENÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL	43
4.4	DIETA HIPERLIPÍDICA	44
4.5	CONSUMO DIETÉTICO	44
4.6	ACOMPANHAMENTO DO PESO CORPORAL E DO CRESCIMENTO	45
4.7	DOSAGENS BIOQUÍMICAS	45
4.8	TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE OU CURVA GLICÊMICA.....	45
4.9	TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA	45
4.10	PERFIL LIPÍDICO HEPÁTICO	46
4.11	AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO	46

4.12	ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA POR WESTERN BLOTTING	47
4.13	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITAVO EM TEMPO REAL (RTQPCR)	48
4.14	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PRESSÓRICOS EM RATOS ACORDADOS	50
4.15	PERFUSÃO DE CORAÇÃO ISOLADO (LANGENDORFF)	50
4.16	PREPARAÇÃO DOS ANÉIS DE AORTA TORÁCICA - PROTOCOLO EXPERIMENTAL	52
4.17	EXPRESSÃO DOS DADOS	55
5	RESULTADOS	56
6	DISCUSSÃO	75
7	CONCLUSÃO	82
	REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas houve uma evolução significativa no número de indivíduos com hipertensão arterial (HA), obesidade e diabetes mellitus tipo 2 (DM 2). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde (2015), a HA atinge mais de 30 milhões de indivíduos e 50% da população apresenta obesidade ou sobrepeso. A relação entre obesidade e HA é documentada em vários estudos (GARRISSON *et al.*, 1987; NGUYEN *et al.*, 2008; KURUKULASURIYA *et al.*, 2011; NGUYEN, LAU, 2012; SLETTEN *et al.*, 2018), mas apesar de suas etiologias serem extensamente investigadas, o tratamento ainda é complexo, principalmente quando estas doenças estão associadas. A hipertensão crônica é a maior causa de hipertrofia ventricular esquerda que comumente progride para disfunção ventricular (LEVY *et al.*, 1996). A Síndrome Metabólica (SM) é definida como um conjunto de alterações metabólicas que irão cursar com o surgimento de diversas patologias destacando-se hipertensão arterial, diabetes *mellitus* e obesidade. Tais patologias estão associadas ao aumento no risco de insuficiência cardíaca e disfunção diastólica (GROSMAN, 1991; SCHILLACI *et al.*, 2004). As anormalidades metabólicas e a obesidade estão vinculadas ao aparecimento de DM 2 e doenças cardiovasculares (DCV), que incluem no seu quadro o aumento do estresse oxidativo, a ativação do sistema nervoso simpático (SNS), ativação do sistema renina angiotensina (SRA) e aumento das citocinas inflamatórias (NISHIMURA *et al.*, 2009; ERTUNC, HOTAMISLIGIL, 2016). Neste contexto, o SRA exerce um importante papel na homeostase do sistema cardiovascular e na patogênese de várias doenças. Classicamente foi mostrado que a ativação do SRA, libera renina do aparelho justaglomerular renal que age sobre o angiotensinogênio (globulina liberada pelo fígado) e forma angiotensina I (Ang I), um decapeptídeo que sofre a ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) transformando-se em angiotensina II (Ang II, um octapeptídeo), o qual por várias vias elevar a pressão arterial (PEACH, 1977). Ainda, a Ang I assim como a Ang II, podem ser biotransformadas e originar peptídeos menores, como a Ang III, Ang IV e a Ang-(1-7). Esses peptídeos quando ativos contrabalançam os efeitos da ANG II por promover vasodilatação, reduzir a absorção de sódio no túbulo proximal, apresentam atividade antiproliferativa, melhora na função cardíaca, reduz o estresse oxidativo (LELIS *et al.*, 2019).

No sistema nervoso central (SNC), a Ang II estimula a área rostro-ventrolateral do bulbo (área pressora) (ANDREATTA *et al.*, 1988), facilita a liberação de noradrenalina (NA) das terminações nervosas simpáticas e desempenha uma retroalimentação positiva entre o SNS e o SRA (FAGARD *et al.*, 1984). A Ang II aumenta a volemia através da estimulação da hipófise posterior que libera o hormônio antidiurético (ADH), o qual age no túbulo coletor distal via arginina vasopressina (AVP), atuando no receptor V2 e estimulando a reabsorvendo água. Ademais, ao atuar no receptor V1 (presente nos vasos periféricos e no miocárdio) promove vasoconstrição (para revisão VINOD *et al.*, 2017). Foi observado ainda, que a Ang II estimula a liberação de aldosterona na zona glomerular renal e age sobre o órgão subfornical, aumentando o apetite por sódio e água (FERRARIO *et al.*, 1988). Nos tecidos periféricos, a Ang II promove redução da sensibilidade dos barorreceptores, o que diminui a eficácia no controle da variação da pressão arterial a cada ciclo cardíaco (OPARIL *et al.*, 1988), além de induzir vasoconstrição e proliferação endotelial (MACHADO *et al.*, 2000).

Por outro lado, vários estudos mostram que a ativação da via da angiotensina (1-7), através do receptor Mas, reduz os níveis pressóricos (SANTOS *et al.*, 2003; SANTOS, FERREIRA, 2007). O SRA é conhecido por alterar a atividade do SNS e evidências experimentais apontam para seu papel nas alterações da morfologia cardiovascular em humanos e em modelos animais de hipertensão arterial (HA) (SCHELLING e FISCHER, 1991; MULVANY, 1995), além de contribuir para o surgimento de resistência à insulina (RI), intolerância à glicose e DM 2 (LEUNG, 2003; LAU *et al.*, 2004).

O aumento dos níveis de renina, angiotensina e aldosterona circulantes, como consequência do aumento da atividade do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), predispõe a instalação do quadro de resistência à insulina (RI), DM 2 e SM, o que explicaria como as ações anti-inflamatórias dos inibidores de enzima de conversão da angiotensina (IECA) e dos antagonistas dos receptores de Ang II beneficiam a prevenção do DM 2, em indivíduos que usaram estes fármacos para tratar a hipertensão arterial (COOPER *et al.*, 2007). Estas ações são corroboradas pelas evidências de que a Ang II é pró-inflamatória e que os antagonistas de receptores de Ang II têm ações anti-inflamatórias (para revisão DAS *et al.*, 2016).

As evidências encontradas na literatura corroboram as hipóteses do envolvimento do SRA nas doenças inflamatórias crônicas como obesidade, uma vez

que esta é um fator de risco importante para o desenvolvimento de distúrbios metabólicos que incluem RI, hiperglicemia, DM 2 (MORRIS, 2008) e, quando associada a HA aumenta o risco das DCV como a insuficiência cardíaca, doença arterial coronariana, doença arterial periférica e acidente vascular cerebral . Nas DCV associadas à obesidade, a Ang II exerce seus efeitos no coração e vasos através do receptor para angiotensina do tipo 1 (AT1 R) (SCHMIEDER *et al.*, 2007) que induz vasoconstrição, efeitos pró-inflamatório, pró-oxidativo, proliferativo e hipertrófico. A obesidade visceral pode levar a RI pela produção de citocinas pró-inflamatórias, pelos adipócitos, como TNF e IL-6, resistência à leptina e adiponectina, o que contribui diretamente para a SM (KLOP *et al.*, 2013). Quando a obesidade é induzida por dieta hipercalórica, ocorre ativação do tecido adiposo e do SRA com elevação da expressão de angiotensinogênio no tecido adiposo intra-abdominal e dos níveis plasmáticos de Ang II (BOUSTANY, 2004; DAS, *et al.*, 2016), o que contribui para retenção de sódio e expansão de volume, doença renal progressiva e elevação da pressão arterial (EL-ATAT, *et al.*, 2004).

A associação de HA e DM é acompanhada de uma elevação do estresse oxidativo, que é maior do que quando da existência de apenas uma dessas doenças, o que sugere que os efeitos desta associação podem induzir efeitos pronunciados no status do sistema redox e nas suas complicações (FRIEDMAN *et al.*, 2003). O estresse oxidativo é consequente ao aumento da produção das espécies reativas de oxigênio (EROS) e redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (ON). Sua presença em várias doenças crônicas é evidente (BRIONES, TOUYZ, 2010). Nos vasos, EROS tem um papel fisiológico no controle da função endotelial e do tônus vascular e, fisiopatológico na inflamação, hipertrofia, apoptose, fibrose, angiogênese e rarefação – fenômenos importantes na remodelação vascular e disfunção vascular associada à HA (TOUYZ, BRIONES, 2011).

Fundamentado nas evidências de que os inibidores de enzima da conversão de angiotensina (IECA) reduzem o desenvolvimento do DM2 em indivíduos com HA, é razoável supor que o uso destes inibidores, em fase precoce da vida, previne o desenvolvimento de RI e doenças cardíacas em animais alimentados com dieta hiperlipídica (DH) desde o desmame até a fase adulta. Portanto, o propósito deste estudo foi investigar se o uso de enalapril, antes da instalação do quadro de hipertensão e obesidade, impede ou atenua às disfunções metabólicas e

cardiovasculares, induzidas pela programação fetal, em ratos espontaneamente hipertensos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como as cardiovasculares, diabetes, câncer e doenças crônicas respiratórias constituem um grande problema de saúde e correspondem a 72% das causas de mortes (BRASIL, 2011). O relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2012) que inclui 194 centros, mostra as evidências do aumento dramático das condições que levam as doenças cardiovasculares (DCV) e outras doenças crônicas. As DCV e o diabetes constituem a primeira causa de hospitalização no sistema público de saúde do Brasil e estão relacionadas ao desenvolvimento de outras doenças crônicas e complicações (BRASIL, 2011).

No Brasil, a HA atinge 36 milhões da população de indivíduos adultos, ou seja, 32,5% da população. Nesse contexto atinge mais de 60% da população de idosos, contribuindo direta ou indiretamente para 50% das mortes por DCV (VII Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial, 2016). Em 2040, a estimativa é 328,4 milhões de homens e 313,3 milhões de mulheres (International Diabetes Federation – IDF, 2015). A HA e a obesidade, como fatores de risco independentes ou associados para o surgimento de DCV contribuem para os desfechos de morbimortalidade e constituem um grave problema de saúde pública.

Em 2015, no mundo, 107,7 milhões de crianças e 603,7 milhões de adultos tinha obesidade. Embora, a prevalência de obesidade entre crianças seja menor do que entre adultos, a taxa de aumento da obesidade infantil em muitos países é maior que a taxa de aumento da obesidade em adultos. O índice de massa corporal (IMC) elevado foi responsável por 4 milhões de mortes em todo o mundo, quase 40% das quais ocorreram em pessoas que não eram obesas. Mais de dois terços das mortes relacionadas ao alto IMC foram consequentes as DCV (AFSHIN; FOROUZANFAR; RESTIMA *et al.*, 2017)

A obesidade é definida como uma doença multifatorial, caracterizada por excesso de massa adiposa, que ocorre através da hipertrofia e hiperplasia adipocitária que é influenciada por fatores genéticos e ambientais (SIRIWARDHANA *et al.*, 2013). Ela é um fator de risco independente para DCV como HA, aterosclerose e doença coronariana, sendo causada por um desbalanço entre a ingestão calórica e o gasto energético, onde o excedente energético é estocado nos adipócitos na forma de lipídios. Consta que na dieta ocidental 40% das calorias

ingeridas são lipídios, enquanto a recomendação varia entre 5 e 10%, portanto esse excesso de consumo contribui para obesidade. A hipertrofia de adipócitos promove a migração de macrófagos e a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, fator de necrose tumoral (TNF), óxido nítrico sintase induzível (iNOS), fator nuclear kappa B (NFkB), proteína C reativa (PCR) e proteína de quimioatração de monócitos (MCP1) que interferem na via de sinalização da insulina levando a resistência à insulina (RI) (WEISBERG *et al.*, 2003; GREENBERG & OBIN, 2006).

O tecido adiposo além de funcionar como reserva energética, também atua como tecido endócrino produzindo vários hormônios que em situações patológicas promovem disfunção endotelial, síndrome metabólica (SM), RI e intolerância à glicose. Essas injúrias sozinhas ou em conjunto podem interromper a homeostase metabólica (MITRA *et al.*, 2009; NISHIMURA *et al.*, 2009). Os tecidos adiposos variam em sua função e dependem do tipo e da localização anatômica do depósito. O tecido adiposo subcutâneo, localizado sob a pele, é responsável pela maioria do tecido adiposo branco total, em humanos (THOMAS *et al.*, 1998). O tecido adiposo visceral, localizado na região perirrenal, intestino (mesentérico e omental), vasculatura (perivascular) e coração, normalmente representa um risco cardiometabólico maior quando da sua expansão (DESPRES *et al.*, 2006). O tecido adiposo marrom localiza-se principalmente na região supraclavicular e em pequenas quantidades na região perirrenal, vasculatura e coração, sendo responsável pela termogênese e preservando a homeostase em resposta a um estímulo térmico.

O adipócito recebe a influência de diversos sinais, como a insulina, cortisol e catecolaminas e secreta várias substâncias que participam da regulação de processos como aterogênese, sensibilidade à insulina e regulação do balanço energético. Algumas dessas substâncias como a leptina, adiponectina, TNF entre outras, apresentam papel fundamental na sensibilidade tecidual à insulina (MOHAMED-ALI; PINKNEY; COPPACK. 1998), sendo amplamente reconhecido o papel da RI como elo entre a obesidade de distribuição central, intolerância à glicose, HA, dislipidemia, hiperuricemia e microalbuminúria (RIBEIRO FILHO *et al.*, 2006). Além de suas ações metabólicas clássicas, a insulina também é anti-inflamatória, diminuindo a atividade de citocinas pró-inflamatórias, como TNF e IL-6, além de reprimir o fator de transcrição nuclear kappa B (NFkB) (DANDONA *et al.*, 2001).

Na clínica, alguns fatores inflamatórios, apesar de inespecíficos, como a proteína C reativa (PCR) e a interleucina-6 (IL-6), têm demonstrado papel preditivo de grande relevância nas DCV (VIDAL *et al.*, 2005). A proteína C reativa de alta sensibilidade (PCR-AS) é um marcador de risco de utilidade clínica em pacientes que potencialmente podem desenvolver doença aterosclerótica, enquanto a IL-6 é uma citocina que está elevada no estresse, na SM e na RI (JUNQUEIRA *et al.*, 2009). A esteatose hepática não alcoólica é consequente ao aumento na captação de ácidos graxos e diminuição da β -oxidação mitocondrial desses ácidos graxos captados. A redução do sistema de β -oxidação mitocondrial aumenta o estoque de lipídios no fígado e estimula a inflamação por aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e apoptose que contribuem para a elevação do risco de fibrose do tecido hepático (MARCHESIN *et al.*, 2001). O fígado tem um papel central na manutenção da homeostase, suprindo os substratos energéticos para tecidos periféricos pelo ciclo de Cori e catabolismo de glicogênio, logo é importante na detoxificação (KOHEN e NYSKA, 2002; RAVAL *et al.*, 2006).

Em geral, o indivíduo obeso apresenta elevação dos níveis séricos de triglicérides e de colesterol associado a elevação da lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) e diminuição do colesterol associado à lipoproteína de alta densidade (HDL-c), que representam dislipidemias associadas ao risco de DCV (RIBEIRO FILHO *et al.*, 2006). A obesidade associada a RI, microalbuminúria, HA e DM 2, constitui o conjunto de anormalidades que formam o quadro conhecido por SM (REAVEN, 1988). A SM é caracterizada pela RI, que está intimamente relacionada ao conteúdo de GLUT4 - uma proteína intracelular transportadora de glicose em tecidos responsivos à insulina (GOVERS *et al.*, 2014). Na obesidade ocorre redução da expressão gênica do GLUT4 (LEGUISSANO, LEHNEN, MACHADO, OKAMOTO, *et al.*, 2012). A relação entre RI e SM foi sugerida como sendo um quadro de origem inflamatória (CHOI *et al.*, 2007) e é a hipótese mais amplamente aceita para o seu desenvolvimento. As citocinas inflamatórias produzidas pelo tecido adiposo como o TNF, IL-6 reduzem a expressão gênica de GLUT 4 (STEPHENS, LEE, PILCH, 1997; ROTTER, NAGAEV, SMITH, 2003) e por consequência reduzem os níveis de captação da glicose pelo músculo, participando do processo de hiperinsulinemia compensatória (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1995).

A obesidade está associada ao aumento na produção de EROs pelos tecidos adiposos, bem como, pelo seu aumento nas mitocôndrias, via cadeia transportadora de elétrons (CHEN *et al.*, 2003). O estresse oxidativo é um dos elos entre a hiperlipidemia e a aterosclerose, sendo implicado em outras desordens metabólicas como no desenvolvimento da RI e nas complicações do DM 2 (GALINIER *et al.*, 2006). Porém, em condições fisiológicas os radicais livres são essenciais para o crescimento celular, a expressão gênica, a defesa do organismo contra infecções e controle das células endoteliais vasculares. Mas, em situações onde há produção excessiva de EROs e as defesas antioxidantes tornam-se incapazes de neutralizar o excesso de radicais livres, há aumento do estresse oxidativo e danos celulares (BOVERIS e CHANCE, 1973; KUNWAR e PRIYADARSINI, 2011).

O sistema de defesa antioxidante é composto por enzimas que degradam EROs em diferentes compartimentos da célula, particularmente a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), glutathione redutase (GSH) e citocromo-c oxidase (aceptor final de elétrons da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria) (RUPÉREZ *et al.*, 2014). A SOD converte os ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através do processo de desmutação. Por ação das enzimas CAT e GPx o H_2O_2 é convertido em água. Para conversão do H_2O_2 em água a GPx reduz a GSH em glutathione oxidada (GSSG). Por ação das enzimas antioxidantes o H_2O_2 é neutralizado no organismo, caso contrário ele pode ser convertido em peróxido de hidrogênio ($OH\cdot$) pela reação de Fenton e Harber-Weiss (citado por LIU, ZHU, BAKER *et al.*, 2015).

Além da cadeia transportadora de elétrons, outras vias metabólicas estão envolvidas no aumento da produção de EROS, como a via enzimática que tem participação direta da NADPH oxidase e a xantina oxidase. A via metabólica do ácido araquidônico é um produtor de ROS via COX-1 e COX-2. Ambas as enzimas catalisam a produção da prostaciclina PGH_2 e podem formar EROS no segundo estágio da produção de prostanóides (PEREZ-VISCAINO, COGOLLUDO e MORENO, 2010). A NADPH oxidase também pode ser ativada por meio da angiotensina II (ANG II) e TNF que contribuem diretamente para aumento do estresse oxidativo e redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (ON) (XU, THUNHORTS, YU, GUO *et al.*, 2016).

2.1 MODELOS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL E OBESIDADE

Na tentativa de estudar a HA humana vários modelos foram desenvolvidos, dentre os quais a hipertensão renovascular (modelo de Goldblat) hipertensão neurogênica (denervação dos barorreceptores sinoaórticos), hipertensão dependente de mineralocorticóides (ou modelo DOCA-sal, que consta da associação de injeções de desoxicorticosterona e cloreto de sódio na água de beber), hipertensão por estenose da aorta, hipertensão por inibição crônica do óxido nítrico e o modelo de hipertensão de origem genética (LERMAN, KURTZ, TOUYS, ELLYSON, *et al.*, 2019).

O primeiro modelo de hipertensão genética foi o GH, originado de uma cepa de ratos Nova Zelândia (FAZAN; SILVA e SALGADO, 2001). Em seguida, o rato espontaneamente hipertenso (SHR) foi obtido originalmente do cruzamento 'inbred' de seus controles normotensos Wistar-Kyoto com ratos Wistar 'inbred' (OKAMOTO e AOKI, 1963). A pressão arterial dessa linhagem apresenta valores normais até a quarta semana de idade e a partir daí a pressão aumenta de forma importante até a 12ª semana, com aumento de modo gradual até a 20ª semana de idade, atingindo entre 180 e 200 mmHg de pressão sistólica. Enquanto, a pressão sistólica da linhagem WKY sofre um aumento até a 10ª semana, estabilizando em 126 mm de Hg. O modelo SHR, é o que mais representa a HA humana, porém, além da hipertensão que é associada ao cromossomo 4 nas linhagens *inbred* e congênicas, é também causada em parte pela deficiência renal de CD36 (AITMAN *et al.*, 1999; PRAVENEK *et al.*, 2008) e hipertrofia ventricular esquerda (FERRANNINI *et al.*, 1987; De FRONZO, 1988).

A semelhança com a HA humana é o motivo pelo qual continua sendo um dos modelos mais usados na investigação dos mecanismos implicados no desenvolvimento e manutenção da HA. Nos estágios precoces da HA desenvolvida pelo SHR, o débito cardíaco (DC) está aumentado e a resistência periférica total (RPT) normal, mas com a evolução do quadro o DC retorna ao normal e a RPT aumenta. Com a progressão da hipertensão, o SHR paulatinamente desenvolve alterações na estrutura cardíaca que culmina em hipertrofia do ventrículo esquerdo, o que ocorre entre 6-24 meses de idade (ENGELMANN; VITULLO e GERRITY, 1987) e, fibrose cardíaca. Nos estágios finais, a função cardíaca começa a ser comprometida e o DC é reduzido, em função do desenvolvimento de uma

insuficiência cardíaca congestiva (FROLICH, 1977 *apud* FAZAN *et al.*, 2001). A frequência cardíaca (FC) desses animais é mais elevada que os seus controles WKY desde a terceira semana de idade, apresentando uma correlação positiva com os níveis de pressão até a sexta semana de vida (para revisão DORNAS & SILVA, 2011).

Ademais, o modelo SHR apresenta disfunção endotelial e RI que podem contribuir para a hipertensão por causar desequilíbrio na regulação dos fatores vasodilatadores (como ON) e vasoconstrictores (como endotelina-1) do endotélio. Logo, é observado aumento do estresse oxidativo, redução da biodisponibilidade de ON e níveis plasmáticos elevados do peptídeo atrial natriurético (PAN) (ROMERO *et al.*, 2013). O PAN e o peptídeo cerebral natriurético (BNP) são secretados do tecido cardíaco, especificamente do átrio e ventrículo. O primeiro atua tanto de forma endócrina quanto parácrina, promovendo redução da pressão arterial e diminuição da hipertrofia cardíaca, enquanto o segundo atua em nível dos ventrículos, onde induz a diminuição da fibrose ventricular (POTTER, YODER, FLORA, *et al.*, 2009). Contudo, em situações patológicas, o ANP e o BNP podem atuar como marcadores para hipertrofia cardíaca (PATEL, VELKOSKA, GAYED, *et al.*, 2018).

Às quatro semanas de idade foi observado ainda, alterações estruturais nas artérias de resistência com maior espessura na camada média (RIZZONI; CASTELLANO; PORTERI; BETTONI *et al.*, 1994). Também foi visto que esses animais apresentam aumento da sensibilidade à noradrenalina (NA) antes mesmo do aparecimento da HA (MULVANI & NYBORG, 1980). Logo, por suas características, este modelo é aparentemente o mais próximo da hipertensão essencial humana, embora sejam reconhecidas suas limitações.

No caso da obesidade, os modelos animais permitem entender os mecanismos que permeiam os vários parâmetros biológicos envolvidos no seu risco, embora seja reconhecido que a obesidade resulta do maior consumo de energia do que do gasto energético. É necessário modelos animais relevantes sobre o impacto das modificações dietéticas nos diferentes períodos de idade, particularmente durante a gestação, lactação e períodos perinatais de vida, que podem esclarecer a melhor estratégia para redução do risco de obesidade e suas complicações.

Existem diferentes modelos de animais, geralmente roedores, que desenvolvem a obesidade a partir de mutações genéticas. Os modelos genéticos de obesidade como os ratos ob/ob, obeso Zucker e obeso espontaneamente hipertenso, são utilizados em estudos sobre o sistema cardiovascular (CONTI *et al.*, 2004; ARTINANO & CASTRO, 2009). Entretanto, como o modelo deve ser o mais próximo possível da gênese da obesidade em humanos, a ingestão de alimentos palatáveis e com alto valor energético parece ser o mais apropriado. Essas dietas podem alterar o metabolismo de glicose, causar hiperinsulinemia e RI (HU *et al.*, 1999, VELOSO, 2015).

2.2 DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

O endotélio desempenha um papel fundamental na regulação do fluxo sanguíneo e do tônus vascular, através da liberação de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras. A sua ampla distribuição e localização na interface sangue/tecido favorece o desempenho de diversas funções relacionadas à homeostase vascular (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980). Dentre as substâncias vasoconstritoras liberadas pelo endotélio destaca-se os derivados do ácido araquidônico (BATLOUNI *et al.*, 2001), ânion superóxido (VANHOUTTE, 1988), a endotelina-1 (YANAGISAWA *et al.*, 1988), a angiotensina II (VELTMARET *et al.*, 1991) e o fator de ativação plaquetária.

O endotélio relaxa a musculatura lisa vascular através do ON (FURCHGOTT, 1983; HUTCHINSON *et al.*, 1987; PALMER *et al.*, 1987), da prostaciclina (PGI₂) (MONCADA *et al.*, 1976) e do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (FÉLÈTOU & VANHOUTTE, 1988). O ON é um gás que se difunde através das membranas celulares e tem um efeito vasodilatador potente, sendo considerado um importante fator na regulação do tônus vascular (MONCADA *et al.*, 1988). O ON é produzido a partir da L-arginina através da enzima óxido nítrico síntase (NOS) (PALMER *et al.*, 1988), a qual possui pelo menos três isoformas, duas das quais são expressas de forma constitutiva nas células (cNOS) enquanto a outra isoforma é induzida nos processos inflamatórios e conhecida como iNOS. A NOS endotelial (eNOS) e a NOS neuronal (nNOS) são constitutivas. A cNOS difere da iNOS, pela primeira ser dependente do complexo cálcio-calmodulina (MARLETTA, 1993). A eNOS foi encontrada nas células endoteliais (MONCADA *et al.*, 1988) e plaquetas

(RAMDOMSKI *et al.*, 1993), enquanto a iNOS é expressa em macrófagos, células endoteliais, células musculares lisas e neutrófilos durante o processo inflamatório, ademais a iNOS é capaz de produzir ON e O_2^- ou ambos, dependendo das concentrações de L-arginina, podendo atuar como principal fonte de EROS no sistema cardiovascular em ratos espontaneamente hipertensos (ANDREW e MAYER, 1999).

O complexo cálcio – calmodulina induz aumento da cNOS com formação de ON que se difunde para as celulares musculares lisas vasculares (CMLV) e ativa a enzima guanilato ciclase solúvel, a qual possui um grupo heme que se associa ao ON, modificando a sua estrutura conformacional e ativando seu centro catalítico, convertendo o 5-trifosfato de guanosina (GTP) em 3'5-monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (BREDT & SNYDER,1990). Nas células musculares lisas, o GMPc ativa a proteína quinase dependente de GMPc, denominada PKG, que fosforila várias proteínas para reduzir a concentração de cálcio intracelular livre e a sensibilidade da máquina contrátil ao cálcio, induzindo assim o vasorrelaxamento (RAPOPORT e MURAD, 1993; RAPOPORT; DRAZNIN; MURAD, 1993). Neste contexto a PKG ativa os canais para potássio, dependentes de cálcio, induzindo hiperpolarização da membrana celular e inibição do influxo de cálcio, através dos canais para cálcio voltagem- dependentes. A PKG ainda pode atuar nas proteínas cálcio-ATPases da membrana plasmática e do retículo sarcoplasmático (SERCA) promovendo o efluxo de cálcio, enquanto na membrana do retículo desencadeia a recaptação do cálcio para seu interior. Ademais, a PKG fosforila o trifosfato inositol (IP_3) na membrana do retículo sarcoplasmático e desencadeia a saída para o citoplasma, o que reduz a sua atividade. Nas proteínas contráteis, a PKG fosforila a proteína miosina quinase de cadeia leve (MLCK) reduzindo sua atividade (RAPOPORT e MURAD, 1993; RAPOPORT; DRAZNIN; MURAD, 1993).

Além de possuir a função relaxante sobre a musculatura lisa vascular, o ON também atua inibindo a proliferação celular, agregação plaquetária e adesão de leucócitos na parede vascular. A capacidade de homeostase endotelial é comprometida no processo fibrinolítico, pois a produção e liberação de ON está reduzida (VIARO *et al.*, 2000). O mecanismo mais aceito para explicar a disfunção endotelial presente na HA é a redução da biodisponibilidade de ON em

consequência ao aumento do seu metabolismo pelo $\cdot\text{O}_2^-$ e pelo aumento da ação de prostanóides vasoconstritores (DOHI *et al.*, 1996 KERR *et al.*, 1998).

A disfunção endotelial em humanos foi caracterizada pela primeira vez por Ludmer e colaboradores (1986) através da demonstração de que artérias coronárias com aterosclerose se contraem em resposta à acetilcolina, enquanto as normais dilatam. Após essa observação, vários estudos demonstraram que em situações fisiológicas, o endotélio mantém o tônus vasomotor reduzido, inibe a proliferação de células musculares lisas, inibe a agregação plaquetária e previne a adesão de leucócitos. A disfunção endotelial pode ser avaliada através da mensuração da vasodilatação dependente do endotélio, em resposta a agonistas que induzem a liberação de ON ou ainda através da medida da capacidade de modulação do ON sobre a resposta contrátil induzida por agentes vasoconstritores, como agonistas α -adrenérgicos (HSUEH; LYON e QUIÑONES, 2004), como a fenilefrina.

A disfunção endotelial está presente em diversas doenças metabólicas e/ou cardiovasculares, como obesidade, intolerância à glicose, DM, HA e dislipidemias. Em todas essas condições, foi verificado que ocorre RI e uma menor resposta a agentes vasodilatadores dependentes de endotélio (HSUEH; LYON e QUIÑONES, 2004). O endotélio e outros componentes da parede vascular são capazes de produzir EROs, como os O_2^- que possuem uma grande capacidade de reagir com o ON, formando o radical peroxinitrito (ONOO^-) que está envolvido com o estresse oxidativo e inúmeros processos de lesão celular, como alterações nos ácidos nucleicos, lipídios e proteínas (POTENZA *et al.*, 2009).

A obesidade é um dos fatores que contribuem diretamente para a disfunção endotelial, uma vez, que a hipertrofia dos adipócitos induz inflamação sistêmica, pela liberação de adipocitocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF), leptina e IL-6. Esse processo inflamatório sistêmico é mediado pelo NF- κ B, cuja ativação promove aumento na produção de EROs e redução da produção de ON nas células endoteliais devido a RI (KOBAYASI *et al.*, 2010).

O sistema heme-oxigenase é um dos mecanismos de defesa do organismo contra o estresse oxidativo e é formado por duas isoformas heme-oxigenase 1 (heme-ox1) e a heme-oxigenase 2 (heme-ox2). Em ratos hipertensos, a heme-ox1 apresenta importante papel na redução da hipertrofia miocárdica, no estresse

oxidativo e no processo inflamatório sistêmico (CAO *et al.*, 2011). Em ratos Zucker obesos e diabéticos, tratados com cobalto de protoporfirina (CoPP), que estimula o sistema heme-oxigenase, observou-se um aumento da heme-ox1, levou a melhora na sensibilidade a insulina e no remodelamento do tecido adiposo, principalmente pelo aumento nos níveis séricos de adiponectina e MAP quinase (NICOLAI *et al.*, 2009).

A NADPH oxidase é a principal fonte de EROs dentro do sistema vascular, embora outras fontes possam contribuir para a disfunção endotelial. A NADPH oxidase possui sete isoformas, porém apenas as isoformas NOX 1, NOX 2, NOX 4 e NOX 5 estão presentes nos vasos sanguíneos. Vários mecanismos estão relacionados ao aumento da ativação da NADPH oxidase endotelial como a ANG II, ET-1, citocinas, insulina, hiperglicemia, produtos da glicação avançada, dentre outros (RAY e SHAH, 2005).

2.3 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

O SRA é descrito como um sistema hormonal presente na corrente sanguínea e em vários órgãos, cujos componentes mantêm a estabilidade hemodinâmica. A despeito de inicialmente acreditar-se que agia apenas no rim (KIMBROUGH *et al.*, 1977), vários estudos mostram que todos componentes do SRA podem ser sintetizados pelo tecido cardíaco (CAMPBELL, 1987; LINDPAINTER *et al.*, 1990; SCHUNKERT *et al.*, 1990). A síntese de enzimas como a renina está aumentada no coração em condições patológicas como no infarto do miocárdio (CLAUSMEYER *et al.*, 1998).

O SRA é um sistema complexo que apresenta cascatas enzimáticas, receptores e peptídeos que estão diretamente envolvidos na patogênese de várias doenças como HA, aterosclerose, nefropatia e disfunção renal (BREWSTER, PERAZELLA, SETARO, 2003). A elevação crônica da Ang II está envolvida no remodelamento ventricular (WEBER *et al.*, 1995), na deterioração da função sistólica e diastólica (McELMURRAY *et al.*, 1999). A descoberta de outras enzimas no coração, tais como as quimases que convertem a Ang I diretamente em Ang II, representa uma via alternativa a da enzima de conversão da angiotensina (ECA) presente neste órgão (CAREY & SIRAGY, 2003). Para exercer sua atividade biológica, a ANG II liga-se, preferencialmente, ao receptor AT1 ocorrendo

vasoconstrição, mas quando se acopla ao receptor AT2 promove vasodilatação (SCHINZARI, TESAURO, ROVELLA, *et al.*, 2011).

A ativação do SRA provoca vasoconstrição sistêmica e estimulação do sistema nervoso simpático (SNS), logo quando ocorre cronicamente leva a hipertrofia cardíaca (WANG, SETO, GOLLEDGE, 2014). Os receptores AT2, na maioria das vezes produzem efeitos contrários aos efeitos causados pela ligação da Ang II em receptores AT1, embora sejam abundantes na vida fetal, são encontrados na idade adulta em vários tecidos, incluindo glândulas adrenais, coração, aorta, rins, ovários, útero e cérebro. Ainda há outros peptídeos da angiotensina que são biologicamente ativos, como a ANG III, angiotensina-(1-7) e ANG IV (SANTOS *et al.*, 2000).

A figura 1, mostra as vias envolvidas na geração de peptídeos ativos Ang-(1-9), Ang II, Ang-(1-7), seus respectivos derivados Ala1-Ang II e alamandine [Ala1-Ang-(1-7)] (para revisão FERRARIO & MULLICK, 2017). A expressão da Ang-(1-12) está aumentada no coração de SHR (JESSUP *et al.*, 2008), o ventrículo esquerdo de ratos expressam o gene humano angiotensinogênio (FERRARIO *et al.*, 2016). A Ang-(1-12) é relatada como fonte para ações da Ang II na modulação do barorreflexo (ARNOLD *et al.*, 2010), no efluxo simpático central (ARAKAWA *et al.*, 2013), e no aumento da contratilidade cardíaca através de propriedades eletrofisiológicas dos miócitos (GIODA, ROMAM-CAMPOS, CARNEIRO-JUNIOR, *et al.*, 2009). A formação da Ang II através da Ang-(1-12) representa uma via não dependente de renina (TRASK *et al.*, 2008). A afinidade da Ang-(1-12) para quimase é muito maior que para ECA (AHMAD *et al.*, 2016). Outra via enzimática constituída pela enzima de conversão de angiotensina 2 (ECA 2), é insensível ao bloqueio por inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA) (DONOGHUE *et al.*, 2000) A ECA 2 hidrolisa Ang I em (Ang (1-9) e Ang II em (Ang 1-7) (OCARANZA *et al.*, 2014). A ECA 2 tem um papel primordial na regulação da formação de peptídeos cardiorrenal protetores Ang-(1-9) e Ang-(1-7), possivelmente por reduzir a concentração de Ang I e Ang II, o que pode ser essencial na DCV (FERRARIO, 2006). Foi mostrado ainda, que a ECA 2 desempenha um papel protetor na fibrogênese e na inflamação de vários órgãos, incluindo pulmão e fígado (LI *et al.*, 2008; OSTERREICHER *et al.*, 2009).

O papel da ECA 2 no fígado é de grande interesse clínico, uma vez que sua ativação está relacionada a efeitos hepatoprotetores, redução do estresse oxidativo e da esteatose hepática. Tais evidências sugerem que o SRA também participa na

regulação da inflamação hepática, na remodelagem do tecido e fibrose após lesão do fígado (CAO *et al.*, 2019). Na fibrose hepática, o SRA está envolvido na ativação de células estreladas hepáticas e na expressão do fator de crescimento beta1 (ABBAS, SILVEIRA, LINDOR, 2011).

A ligação da Ang (1-9) ao receptor AT2 em animais hipertensos é capaz de promover diminuição da pressão sanguínea, reverter o remodelamento cardiovascular, reduzir os níveis de ECA, os níveis de Ang II e diminuir o estresse oxidativo cardiovascular (OCARANZA, 2014). Após ativação dos receptores AT2, pode ocorrer ativação de três vias de sinalização: 1) ativação da serina/treonina fosfatase, com inibição da via da ERK $\frac{1}{2}$ e redução do estresse oxidativo pela inibição da NADPH oxidase; 2) ativação da fosfolipase A2 e produção de ácido araquidônico que promove hiperpolarização celular, cursando com redução da ativação do SNS; 3) ativação dos receptores para bradicinina que promove fosforilação da eNOS pela PKA, induzindo assim o aumento da produção de ON, que por sua vez estimula à guanilato ciclase e eleva a produção de GMPc, o que induz o vasorrelaxamento (ABADIR, CAREY & SIRAGY, 2003), (Figura 2).

A ativação do SRA é descrita como um mediador importante na HA associada à obesidade (CABANDUGAMA *et al.*, 2017). Considerando-se que a elevação da PA, não é apenas devido a estimulação do SNS e compressão tubular renal, mas também a disfunção do tecido adiposo (SCHUTTEN *et al.*, 2018) Em SHR, a hiperatividade tanto do SNS quanto do SRA desempenha papéis cruciais no desenvolvimento e manutenção da HA. O SRA está super expresso quando associado com obesidade e suas comorbidades, podendo ser um alvo estratégico no tratamento farmacológico desta patologia (LUTHER *et al.*, 2011). O aumento da expressão de Ang II no tecido adiposo e a atividade elevada do SRA são evidências que corroboram a implicação desse sistema na RI e DM2 (DAVIDSON *et al.*, 2011).

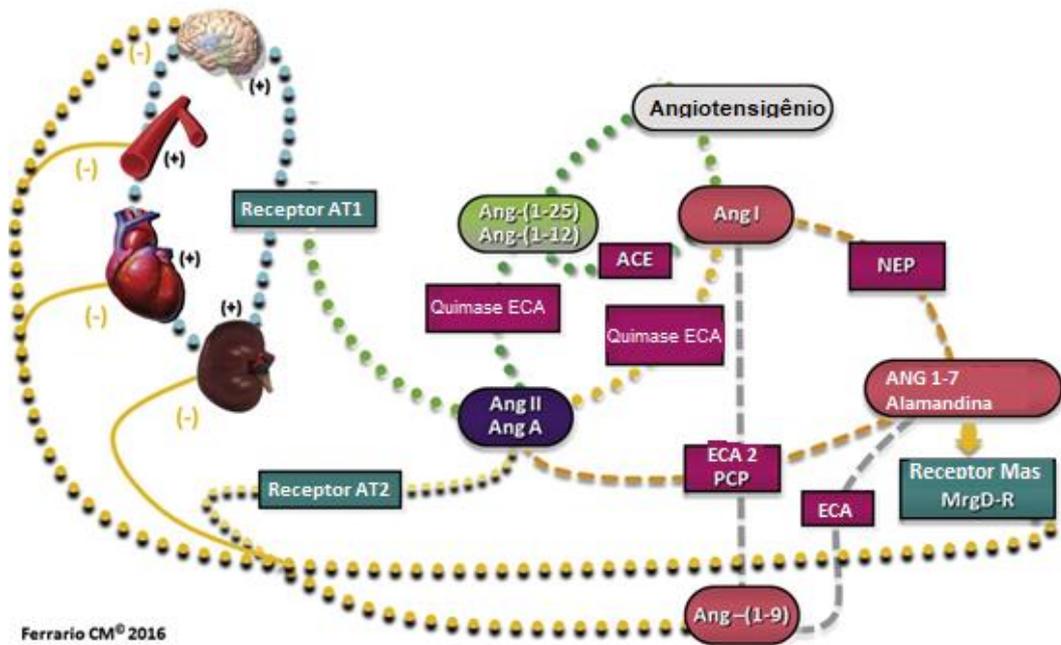


Figura 1: Sistema Renina -Angiotensina. Vias envolvidas na geração de peptídeos bio-ativos ang-(1-9), ang ii, ang-(1-7), seus respectivos derivados ala1-ang ii e alamandine [ala1-ang-(1-7)] adaptado de ferrario & mullick, 2017.

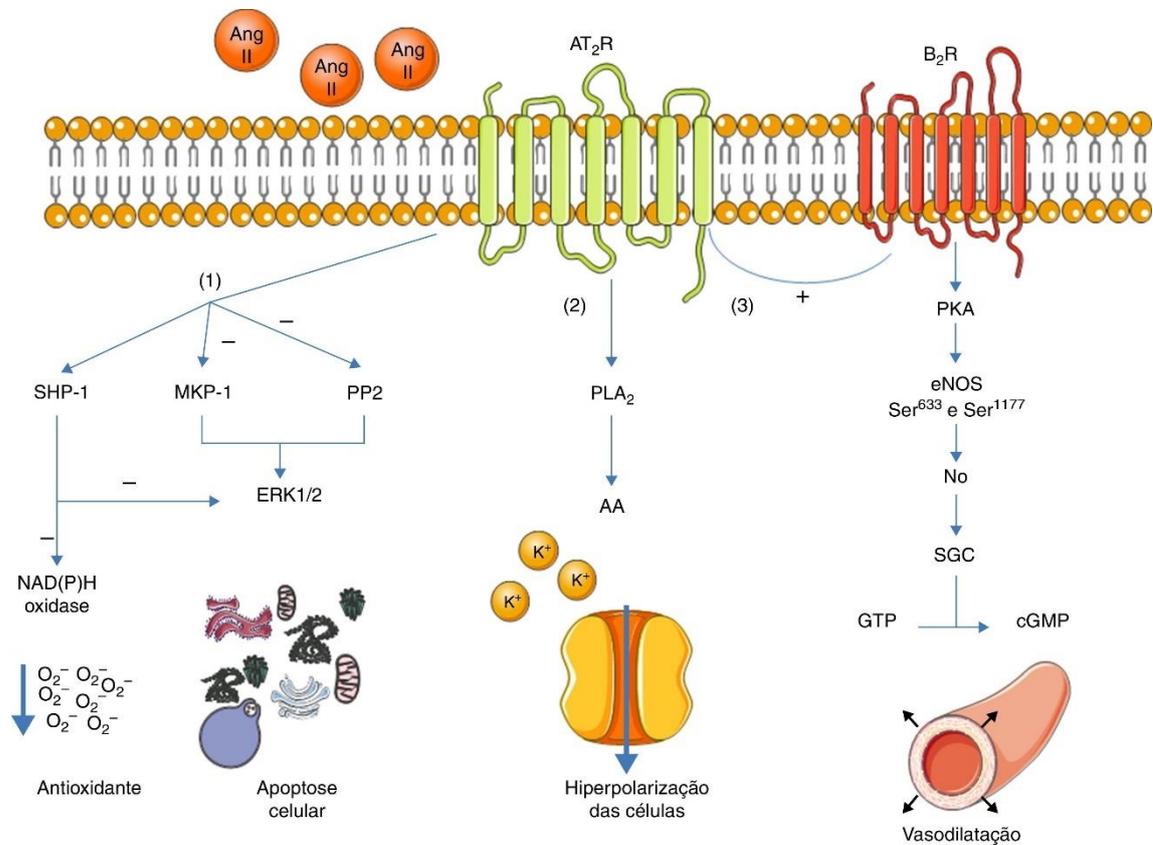


Figura 2: Principais vias de sinalização do receptor para angiotensina 2 (AT₂R). A ativação do AT₂R conduz a 1) ativação de fosfatases de serina/treonina; 2) ativação da fosfolípase A₂; 3) e ativação da via bradicinina/NO/GMPc o que culminaria com a redução do estresse oxidativo, apoptose celular, hiperpolarização celular e vasodilatação. Adaptado Faria-Costa *et al.*, 2014. Ang II- angiotensina 2, AT₂R- receptor de angiotensina 2, B₂R- receptor de bradicinina, PLA₂- fosfolípase A₂, AA- ácido araquidônico, PKA- proteína quinase A, NO- óxido nítrico, SGC- guanilato ciclase, PP2- proteína fosfatase 2, SHP1- tirosina fosfatase 1 e MKP1- MAP quinase fosfatase. Componentes da figura retirados do website: <http://www.servier.co.uk/medical-art-gallery/>

O SRA juntamente com o estresse oxidativo promove a expressão de citocinas, NFκB e proteína de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) que estão relacionadas ao processo inflamatório e remodelamento cardiovascular. Ao ativar a subunidade p47 da NAPH oxidase há um aumento dos radicais livres em nível intra e extracelular, bem como a ativação de várias cascatas mediadas por proteína quinase C (PKC), Janus quinase 2 (JAK2), fosfatidil 3 inositol quinase (PI3K), FAK e fosfolipase C (PLC), que promovem translocação da subunidade p65 da NFκB e ativação da AP1 com aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias (RENNA, LEMBO, DIEZ e MIATELLO, 2013).

A ativação do SRA também está relacionada ao aumento na produção de EROs que promovem redução do relaxamento dependente do endotélio observado na HA, bem como alterações na resposta contrátil e remodelamento vascular (KANE; ETIENNE-SELLOUM; MADEIRA *et al.*, 2010). A ANG II aumenta a produção de ânion superóxido (O_2^-) pela ativação da NADPH oxidase, principal fonte de EROs. A ligação da ANG II ao seu receptor leva também ao aumento da expressão da COX 2 e produção de prostanóides derivados da COX, como tromboxano A2 e prostaciclina em diferentes células vasculares (ÁLVAREZ; PÉREZ-GIRÉN; HERNANZ; BRIONES *et al.*, 2007).

Em camundongos C57BL6, tratados com ANG II, foi demonstrado que a disfunção vascular e a HA estariam relacionadas com o aumento da produção de EROs e de prostanóides derivados da COX (MARTÍNEZ-REVELLES, 2013).

2.4 INIBIDORES DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA

Os IECA inibem a enzima que converte a ANG I em II (substância vasoconstritora), mas não bloqueiam toda a produção de ANG II. Além da via clássica, 40% da ANG II é produzida por uma via alternativa, chamado “fenômeno de escape”. Desde a introdução dos IECA, captopril, lisinopril, ramipril e enalapril, foi mostrado que estes fármacos não atuam apenas na redução da pressão arterial, mas são capazes de reduzir a progressão de doenças renais, cardíacas e/ou vasculares. No entanto, nos últimos anos, o SRA ganhou mais atenção dos pesquisadores para o seu papel em vários aspectos da (PERKINS e DAVIS, 2008; FRANTZ *et al.*, 2013), mostrando-se que o uso de IECA é capaz de aumentar a sensibilidade à insulina. Isto contribui para hipótese de uma interação entre a

insulina e a angiotensina II na regulação do metabolismo do tecido adiposo (PERKINS e DAVIS, 2008).

O enalapril é uma pró-fármaco que ao ser ingerido é metabolizado em enaprilato, o qual atua inibindo a conversão da ANG I em ANG II, além de promover o aumento dos níveis de renina plasmática e a redução da secreção de aldosterona (VII Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial).

O uso de IECA no tratamento da HA reduz a progressão da hipertrofia cardíaca e diminui a produção de EROs como consequência da menor ativação da NAPHoxidase, reduz a disfunção endotelial, além de promover melhora na sensibilidade à insulina (SOWERS, 2002; WEN *et al.*, 2012). O enalapril é um dos IECA mais utilizados no tratamento da HA sendo relatado que é capaz de reduzir o peso corporal (SANTOS *et al.*, 2008), porém os mecanismos implicados nesta redução ainda não estão completamente esclarecidos. Esta evidência abre a perspectiva de uso de IECA no controle da SM. Entretanto, alguns estudos mostram que o uso precoce de enalapril, no primeiro dia de nascimento, em ratos, pode induzir obesidade na vida adulta (de PICOLI SOUZA, 2015). Estes achados não são corroborados quando o tratamento foi realizado em uma idade mais tardia (AL-HARBI *et al.*, 1992; SANTOS *et al.*, 2008). Portanto, maiores esclarecimentos são necessários.

Experimentalmente tem sido visto que em SHRs, o SNS e o SRA desempenham papéis fundamentais no desenvolvimento e manutenção da HA. Por outro lado, foi observado que o SRA é super expresso quando associado à obesidade e suas comorbidades, podendo ser um alvo estratégico no tratamento farmacológico desta patologia (LUTHER *et al.*, 2011). Portanto, a nossa hipótese é de que o quadro de doenças cardiometabólicas, desenvolvido em animais hipertensos que consomem uma dieta rica em lipídeos, pode ser prevenido quando da administração precoce de enalapril.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Investigar os efeitos da inibição do sistema renina angiotensina sobre os impactos causados pelo consumo de uma dieta baixa em carboidratos/rica em lipídios, em ratos espontaneamente hipertensos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos do enalapril, administrado desde o desmame, antes do estabelecimento da HA, até a idade adulta sobre:

- Os parâmetros metabólicos, perfil lipídico e glicêmico;
- Os níveis pressóricos e a frequência cardíaca em animais não anestesiados;
- A hipertrofia cardíaca e a função cardíaca *in vitro*;
- A expressão gênica do PAN e do BNP no ventrículo esquerdo;
- O estresse oxidativo cardíaco;
- Avaliação da expressão proteica da Cox 1, Cox 2 e da Nox 4;
- A resposta vascular em artérias de condutância

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados SHRs (n= 72), machos, com 21 dias de idade, fornecidos pelo biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco. Estes animais (n = 4 por caixa) foram mantidos no sistema de caixas ventiladas (Tecniplast®) sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclo claro-escuro de 12 horas, umidade (55%), com livre acesso à água e alimentação.

4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os procedimentos adotados no manejo dos animais seguiram as normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e das recomendações da Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório (SBCAL). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (Processo nº 0001/2015).

4.3 OBTENÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL

Aos 21 dias de idade, os animais foram randomicamente separados em quatro grupos experimentais: **i)** dieta padrão (Controle) - animais que foram alimentados com a dieta padrão ou *chow* (Labina, Presence®); **ii)** dieta hiperlipídica (DH) - animais que foram alimentados com uma dieta rica em lipídios e baixa em carboidratos; **iii)** dieta hiperlipídica + enalapril (DH+E) - animais que consumiram a DH e foram tratados com enalapril (20 mg/kg/dia, v.o.); **iv)** dieta padrão + enalapril (C+E) - animais que consumiram a dieta padrão e foram tratados enalapril (20 mg/kg/dia, v. o.) (Figura 5). Os animais que foram submetidos à DH foram tratados simultaneamente com enalapril desde o primeiro dia do desmame, durante 12 semanas. Após este período foram submetidos aos diversos protocolos experimentais.

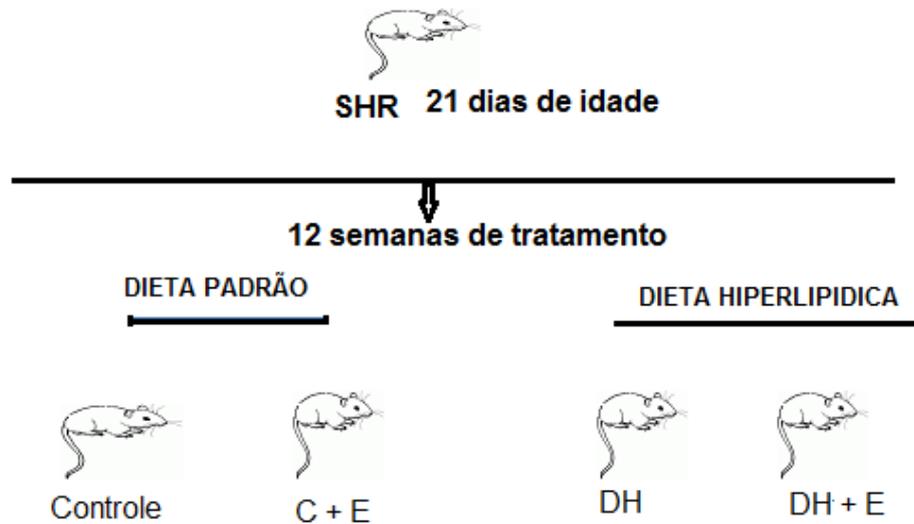


Figura 4: Esquema do delineamento experimental. Controle: ratos espontaneamente hipertensos (SHRs) alimentados com a dieta padrão (chow), Controle +E: SHRs alimentados com dieta padrão e tratados com enalapril (20mg/kg, via i.p.); DH: SHRs alimentados com dieta hiperlipídica, não tratados ; DH + E : SHRs alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com enalapril (20mg/kg, v.o.).

4.4 DIETA HIPERLIPÍDICA

A DH experimental, em forma de “pellets”, foi fornecida pelo Laboratório de Reatividade Cardiovascular (LRC) da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Luiza Antas Rabêlo. A dieta comercial padrão (chow) foi obtida da Presence®. A composição dietética foi expressa como porcentagem (%) da energia metabolizável: dieta hiperlipídica (26,6% kcal de carboidratos; 58,4% kcal de lipídios; 15% kcal de proteína, ou seja, caseína) e foi confeccionada segundo Nunes-Souza e colaboradores (2016). Dieta padrão (63% kcal de carboidratos, 14% kcal de lipídios, 23% proteínas). Os conteúdos minerais e vitamínicos da DH foram adicionados de acordo com as necessidades de animais de experimentação descritas nas normas do Instituto Americano de Nutrição (AIN 93-G) Growth Purified (REEVES et al., 1993 a, REEVES et al. 1993b).

4.5 CONSUMO DIETÉTICO

A ingestão dietética foi acompanhada diariamente, sempre no mesmo horário do dia e mensurada através da subtração diária entre a cota alimentar oferecida e o rejeito do dia subsequente.

4.6 ACOMPANHAMENTO DO PESO CORPORAL E DO CRESCIMENTO

A evolução da massa corporal foi acompanhada desde o nascimento, semanalmente, durante todo o experimento. O comprimento da tíbia foi tomado como medida de crescimento.

4.7 DOSAGENS BIOQUÍMICAS

Foram determinadas as concentrações plasmáticas de glicose, colesterol total e HDL-c e triglicérides, através dos kits comerciais Labtest® (Lagoa Santa, MG). Os níveis de ácidos graxos não esterificados (NEFA) foram determinados através de kit comercial (Wako Chemicals GmbH, Neuss - Germany) e os níveis de leptina foram mensurados através de imunoenensaio ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) sanduíche (Millipore®).

4.8 TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE OU CURVA GLICÊMICA

Para analisar possíveis alterações no metabolismo da glicose, os ratos foram submetidos a jejum de 10-12 horas seguido de um teste oral de tolerância à glicose (TOTG). Amostras de sangue foram retiradas da cauda antes e após a administração de glicose por via oral (2g/kg). A glicemia foi determinada com auxílio de um glicosímetro após 0, 30, 60 e 120 minutos. A tolerância à glicose foi obtida através da área sob a curva.

4.9 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA

O teste de intolerância a insulina (TTI) foi realizado após 48 horas do TOTG. Os animais foram submetidos a um novo jejum de 10 horas e depois de determinada a glicemia de jejum (considerada como tempo zero- T_0) injetou-se insulina regular (1,5 U/kg, via intraperitoneal) mensurando-se a glicemia em intervalos de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. A tolerância à insulina foi obtida através da área sob a curva e confirmada pela razão da constante de decaimento da glicose (KITT), a qual foi calculada através da fórmula $0,693/t_{1/2}$. A $t_{1/2}$ glicose foi calculada usando-se a análise da queda do qui quadrado da concentração de glicose plasmática durante o decaimento da fase linear (BONORA *et al.*, 1987).

4.10 PERFIL LIPÍDICO HEPÁTICO

A extração dos lipídios totais hepáticos foi realizada pelo método de FOLCH e colaboradores (1957). Os SHRs de todos os grupos experimentais foram eutanasiados e o tecido hepático extraído e pesado. Em seguida, 100mg de fígado foi colocado em tubos de ensaio com 1,9 mL de solução clorofórmio: metanol (2:1) para trituração em homogeneizador e adição de 400 µL de metanol. Em seguida, os tubos foram centrifugados (3000 r.p.m. por 10 minutos) e o sobrenadante transferido para novos tubos. Foi adicionado ao sobrenadante, 800 µL de clorofórmio, 640 µL de solução aquosa de NaCl 0,73% e as amostras foram novamente centrifugadas (3000 r.p.m. vs. 10 minutos), sendo desprezada a fase superior. Sequencialmente, cada tubo foi lavado três vezes com 600µL de solução de Folch (3% de clorofórmio + 48% de metanol + 47% de água destilada + 2% de NaCl a 0,9%). Feito isto, os tubos foram mantidos em estufa 37°C durante a noite e a quantidade de lipídios extraída, foi obtida pela diferença de peso dos tubos antes e depois de secos. A dosagem de lipídios foi realizada utilizando kit comercial Labtest® (Lagoa Santa, Brazil). Da mesma forma, foram mensurados os níveis de colesterol, triglicérides e NEFA, utilizando kits comerciais (ensaio colorimétrico, Labtest®, Lagoa Santa Brazil) de acordo com as instruções e adaptações para microplacas (Thermo Scientific, Programa 2.4 Multiskan Spectrum, Vantaa, Finland) (NUNES *et al.*, 2016).

4.11 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

Os níveis de EROS foram mensurados por meio de uma reação fluorométrica entre o homogenato cardíaco (50 µL) e o reagente de diacetato de diclorofluoresceína (DCF-DA) (50 µL), em placa de 96 poços de poliestireno. As reações foram incubadas durante 45 minutos, a 37°C. Os produtos finais dessa reação foram convertidos em DCF, composto altamente fluorescente na presença de ROS, conforme descrito por NIJMEH e colaboradores (2010). A fluorescência foi mensurada a 504 nm (excitação) e 529 nm (emissão).

Os níveis de nitrito foram quantificados através da utilização do reagente de Griess, um indicador da produção de óxido nítrico, conforme descrito por Green e colaboradores (1982). A reação ocorreu durante 10 minutos à temperatura ambiente (± 25 °C). A absorbância desta reação foi mensurada em um comprimento de onda de 540 nm em leitor de placas.

A atividade da SOD foi mensurada de acordo com Misra e Fridovich (1972). Em resumo, os homogenatos cardíacos (60 μ L) foram previamente incubados a 37 $^{\circ}$ C por 10min e adicionou-se tampão de carbonato de sódio (920 μ L por amostra, 0,05%, pH = 10,2) em EDTA 0,1 mM. A reação foi iniciada pela adição de 20 μ L de epinefrina (150 mM) diluída em ácido acético (0,05%). Mensurou-se as absorbâncias a 480 nm, em intervalos de 15 segundos, durante 3 min,

A atividade da CAT foi realizada de acordo com Aebi (1947). Para isto, foram utilizados os homogenatos teciduais (60 μ L) adicionados de 905 μ L de tampão de fosfato de sódio (pH 7,0) e 35 μ L de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , 300 mM). Foram mensuradas as absorbâncias a 240 nm, nos intervalos de 10 segundos, durante 3 min.

Os níveis de glutatona (GSG) e glutatona oxidada (GSSG) foram estimados de acordo com Hissin e Hilfi (1976). A quantificação dos níveis de GSG foi realizada por adição de tampão fosfato (100 mM) + EDTA (5 mM), pH 8,0; com a adição de 50 μ L do sobrenadante do homogenato. Então, a 50 μ L desta mistura, adicionou-se 140 μ L de tampão de fosfato (100 mM) e 10 μ L de solução de orto-ftaldeído (OPT), os quais foram pipetadas em placas de 96 poços, incubando-se durante 20 min à temperatura ambiente (\pm 25 $^{\circ}$ C). Para determinação dos níveis de GSSG, o sobrenadante (50 μ L) foi incubado com N-etilmaleimida (NEM, 20 μ L, 0,04 M), durante 30 min, à temperatura ambiente (\pm 25 $^{\circ}$ C). Em seguida, foram adicionados 430 μ L de hidróxido de sódio (NaOH; 0,1M). Logo após, a 50 μ L desta mistura foi adicionado 140 μ L de NaOH e 10 μ L de OPT em placas de 96 poços. Ambos, GSG e GSSG foram mensurados a 350 nm.

4.12 ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA POR WESTERN BLOTTING

O ventrículo esquerdo foi homogeneizado em tampão de extração (KCl 90 mM, Hepes 10 mM, $MgCl_2$, 3 mM + EDTA 5mM, glicerol 1%, DTT 1 mM, SDS 0,04% ; pH 7,4). A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford, onde 200 μ g da proteína foram separadas por eletroforese em gel de SDS-Poliacrilamida (Sódio Dodecil Sulfato-Poliacrilamida, 6-15%), e então transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad[®]).

A membrana foi marcada com solução de Ponceau para confirmar a transferência. Posteriormente, a membrana foi lavada em tampão salina Tris Tween-20 (TBST; 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5, adicionando-se 2% de Tween-20), 3 vezes por 10 min, em temperatura ambiente. As membranas foram incubadas à 4° C por 12 horas, com anticorpo primário específico contra as proteínas de interesse. O anticorpo contra β -actina foi utilizado como controle da reação de Western blot. Após lavar as membranas com TBST para remover o anticorpo primário, os “blots” foram incubados durante uma hora, em temperatura ambiente, com o anticorpo secundário ligado à peroxidase (titulação 1:5000-10000). Após a ligação do anticorpo secundário foi acrescentada uma solução de ECL (Amersham Biosciences®), que ao reagir com a peroxidase do anticorpo secundário, produziu uma reação quimioluminescente, permitindo a identificação de bandas referentes à marcação de proteínas específicas ao anticorpo primário. Estas bandas foram quantificadas com auxílio do programa ImageJ 1,44 (National Institute of Health, EUA).

Foram analisadas as expressões proteicas da COX 1 e 2, responsáveis pela resposta vasodilatadora e, da Nox 4.

4.13 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (RTQPCR)

A extração do RNAm das amostras do ventrículo esquerdo dos grupos Controle, C+E, DH e DH+E foi realizada com o reagente Trizol® (Ambion, Life Technologies Corporation). Para isto, em tubos contendo esferas de cerâmica e um fragmento de 100 mg do tecido, pipetou-se 1mL de Trizol e realizou-se a homogeneização das amostras através de agitação em alta velocidade (Tissue Lyser II, QIAGEN), durante 20 min. Após este procedimento, foi realizada a separação do RNA. Para isto, foi pipetado 200 μ L de clorofórmio nos tubos com as amostras homogeneizadas, os quais foram agitados durante 15 segundos e, em seguida, incubados à temperatura ambiente por 3 min. Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 12.000 r.p.m. durante 15 min, a 4 °C. A fase que continha o RNA, (sobrenadante, ~ 500 μ L), foi pipetada em outro tubo contendo 500 μ L de isopropanol, com o objetivo de precipitar e isolar o RNAm. Em seguida, esta mistura foi agitada e incubada em temperatura ambiente por 10 min. Foi realizada nova centrifugação a 12.000 r.p.m., durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento formado pelo RNA foi lavado com 1 mL de etanol (75 %),

o qual foi preparado com água livre de RNase. Os tubos foram agitados e centrifugados a 7.500 r.p.m. por 5 min, a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e os tubos foram vertidos em superfície limpa para permitir total secagem do sedimento de RNA, à temperatura ambiente, por 10 min. O sobrenadante foi ressuspensão com cerca de 50 µL de água isenta de RNase, em seguida foi incubado à 55 °C, durante 10 min. O RNA foi quantificado na absorbância de 260 nm (Varioskan®, Thermo Fisher Scientific).

O grau de pureza das amostras foi quantificado por meio da medida da absorbância em 230 nm e 280 nm. A relação 260/280 avaliou a contaminação com proteína e 260/230 a contaminação com fenol. O resultado de ambas ficou dentro dos valores aceitáveis (entre 1,8-2,2). Para o cálculo do RNA, utilizou-se a fórmula: RNA µg/mL = (Absorbância 260-Branco) x 40 x (10/0,5).

Na sequência, 2 µg do RNA total foi tratado com a enzima DNase (Promega®). O DNA complementar (cDNA) foi transcrito utilizando-se a enzima transcriptase reversa (Reverse Transcriptase – Invitrogen®). Em 10 µL de volume de RNA tratado com DNase adicionou-se 1 µL de random hexamer primer e 2 µL de desoxinucleotídeos (dNTPs) (Invitrogen®). A mistura foi incubada em termociclador a 65°C por 10 min (SureCycler 8800, Agilent Technologies®). A transcrição reversa foi realizada com adição de 1µL de transcriptase reversa, 4 µL de tampão (contendo 250 mM de Tris-HCl, pH 8,3; 375 mM de KCl, 15 mM de cloreto de magnésio), 2 µL de ditiotreitol (DTT) e 0,5 µL de inibidor de ribonuclease (Invitrogen®), seguida de incubação a 25 °C durante 10 min, 37 °C por 50 min e 70 °C por 15 min, em termociclador. O cDNA (100 ng/µL em volume final de 20 µL) foi posteriormente armazenado à -80°C. O cDNA obtido, foi diluído para concentração final de 25 ng/µl e, na sequência, amplificado usando a enzima Taq polimerase (GoTaq qPCR Master Mix, Promega®) por reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (Real time qPCR) em AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies).

Foram utilizados os seguintes *primers*: Peptídeo ANP (Forward –AGT GCG GTG TCC AAC ACA G/ Reverse -CTT CAT CGG TCT GCT CGC T), BNP (*Forward* - CAG AAC AAT CCA CGA TGC AG/ Reverse GCT GTC TCT GAG CCA TTT CC e GAPDH (*Forward* –TGG TGG ACC TCA TGG CCT AC/ Reverse -CAG CAA CTG AGG GCC TCT CT) como controle interno de cada amostra. A reação foi realizada

em duplicata utilizando-se os protocolos: 95 °C por 2 min e 15 s, durante 40 ciclos e 60 °C por 1 min.

O RNA foi quantificado como um valor relativo em comparação a uma referência interna, o GAPDH. A análise da expressão foi obtida pela elevação negativa do $\Delta\Delta CT$ (*threshold cycle*) na base 2 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). O valor de CT representa o momento da reação onde a fluorescência da amostra é detectada acima do ruído de fundo (*background*). O resultado foi expresso em unidades arbitrárias.

4.14 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PRESSÓRICOS EM RATOS ACORDADOS

Para a medida direta da pressão arterial (PA) e da frequência cardíaca (FC) às 12 semanas de idade, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) e um cateter (PE 50) heparinizado (125 UI/mL de heparina em salina isotônica), foi introduzido via artéria femoral esquerda até a aorta abdominal (para o registro da PA). Este cateter foi exteriorizado dorsalmente, em nível da nuca (LAHLOU E DUARTE, 1998). Após a cirurgia, os animais foram mantidos em gaiolas individuais para recuperação anestésica. Vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico, o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão acoplado a um sistema de aquisição de dados PowerLab (modelo ML870, ADInstruments) ligado a um amplificador de sinal (modelo ML228) para mensuração da pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC). A pressão arterial média (PAM) foi calculada através da equação: $PAD + [(PAS - PAD)/3]$. Para análise do sinal foi utilizado o programa Chart™ v 7.0 (ADInstruments®).

4.15 PERFUSÃO DE CORAÇÃO ISOLADO (LANGENDORFF)

Os animais dos diferentes grupos experimentais foram sacrificados sob anestesia (pentobarbital sódico, 50 mg/kg, i.p.). Após toracotomia, o coração foi excisado, submerso rapidamente em solução de Krebs Henseleit (K-H) gelada, os pulmões e tecido adiposo foram removidos. Em seguida, o coração foi fixado através da aorta a uma cânula de aço, após remoção dos pulmões e do tecido gorduroso. Foi perfundido retrogradamente, a 75 mmHg, com solução de Krebs-Henseleit

(contendo em mM: NaCl 129; KCl 5,6; MgCl₂ 1,25; NaHCO₃ 21; CaCl₂1,25; NaH₂PO₄ 1,2). Foi adicionado glicose (10 mM) como substrato e piruvado de sódio (2 mM) como co-substrato com o objetivo de preservar o desempenho cardíaco durante 120 min de perfusão. Esta solução foi saturada continuamente com uma mistura de 95% de O₂ + 5 % de CO₂ que manteve o pH em 7,4. A temperatura foi mantida em 37°C e a pressão de perfusão foi mantida em 75 cm de água.

A função ventricular esquerda foi avaliada através da inserção de um balão intraventricular como descrito por Fallen e colaboradores (1966). Brevemente, um balão de látex foi inserido no ventrículo esquerdo através do átrio esquerdo, seu volume foi ajustado para produzir uma pressão diastólica ventricular final de 8-10 mmHg que foi mantida durante todo experimento (simulando a pré-carga). O balão foi conectado a um transdutor de pressão acoplado a um amplificador (Octal Bridge Amplifier, modelo ML228) conectado ao sistema de aquisição de dados (PowerLab 8/30, modelo ML870) (Figura 5). Os batimentos cardíacos foram mantidos espontaneamente. Para avaliar a função sistólica do ventrículo esquerdo foram utilizadas as medidas de pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo - PSVE (definida como a diferença entre o pico de pressão sistólica do ventrículo esquerdo e a pressão diastólica ventricular esquerda). A primeira derivada positiva (+dP/dtmax) foi estimada como estimativa da contratilidade (BULLOCK *et al.*, 1995). O coração foi perfundido por um período de 30 a 45 min para garantir sua estabilização, em seguida os valores basais foram registrados.

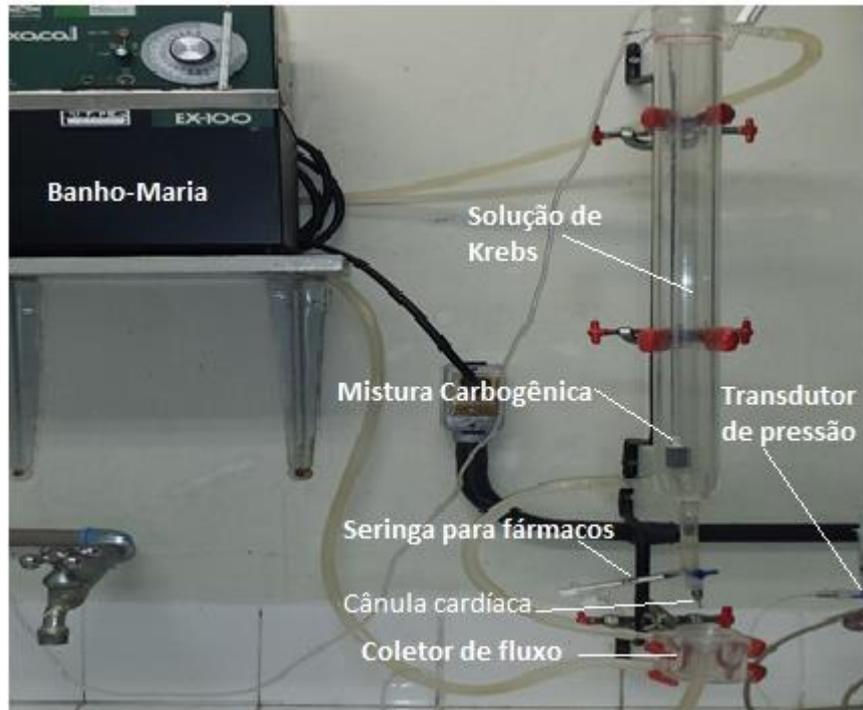


Figura 5: Aparelho de Langendorff.

Curvas concentração-resposta foram realizadas com concentrações aumentadas, em bolus, de Isoproterenol (ISO, 10^{-12} a 10^{-4} M). As infusões de ISO respeitaram um intervalo de 5 a 10 min, período em que os valores de PSVE e FC retornaram aos seus valores basais.

4.16 PREPARAÇÃO DOS ANÉIS DE AORTA TORÁCICA - PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os ratos anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/ kg, i.p.) foram exsanguinados. A aorta torácica foi removida, dividida em segmentos de 3mm de comprimento, livres de tecido adiposo e conjuntivo, imersos em solução de Krebs Henseleit (K-H) modificada, cuja composição (em mM): NaCl 118; KCl 4,7; NaHCO_3 25; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5; glicose 11; KH_2PO_4 1,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2 e EDTA 0,01. Para obtenção do registro de tensão isométrica, cada anel vascular foi colocado em um sistema para órgãos isolados. Cada cuba, continha 5 mL de solução de K-H aquecida a 37°C , continuamente gaseificada com mistura carbogênica, mantendo o pH estável em 7,4. Dois fios de metal foram inseridos no lúmen das artérias. Um fio metálico foi fixado à parede do banho e o outro conectado verticalmente a um

transdutor de tensão isométrica (LETICA Scientific Instruments, TRI-210). A tensão isométrica foi registrada através deste último, o qual estava conectado a um sistema de aquisição de dados (Powerlab, ADInstruments™). Os anéis das artérias foram submetidos a uma tensão de repouso de 1,0 grama, a qual foi reajustada a cada 15 minutos, durante 45 minutos de estabilização. Após estabilização, os anéis de aorta foram contraídos com o cloreto de potássio (KCl, 75 mM) para comprovar a viabilidade das artérias. A contração induzida pelo KCl (75 mM) foi considerada como a contração máxima da artéria.

A integridade endotelial foi avaliada pelo relaxamento induzido pela acetilcolina (Ach, 10 mM) nos anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina (FEN, 10 mM), onde a contração correspondeu a 50-70% da contração ao KCl. O relaxamento à acetilcolina maior do que 30% foi considerado como demonstrativo da integridade funcional do endotélio. Após 60 min, realizaram-se as curvas de concentração-resposta cumulativa para Ach (10^{-10} M - 10^{-4} M) (Figura 6 A). A preparação foi lavada e ficou em repouso durante 60 min, realizando-se em seguida, a curva concentração-resposta cumulativa para FEN (10^{-10} M - 10^{-4} M) (Figura 6 B). A preparação foi então lavada até retornar aos valores basais e foi pré-contraída com FEN (10 mM). Ao atingir o platô, realizou-se uma curva concentração-resposta para nitroprussiato de sódio (NPS, 10^{-10} M – 10^{-4} M).

O papel do ON na resposta vascular de SHRs alimentados com a DH tratados ou não com enalapril foi investigado em segmentos de aorta pré-incubados com L-NAME (100 μ M, inibidor de ON síntese). Para avaliar o papel dos derivados da ciclooxigenase sobre possíveis alterações no relaxamento endotélio-dependente, os segmentos arteriais foram pré-incubados com indometacina (INDO) (um inibidor não-seletivo para COX-1 e COX-2, 10^{-2} M) (Figura 7).

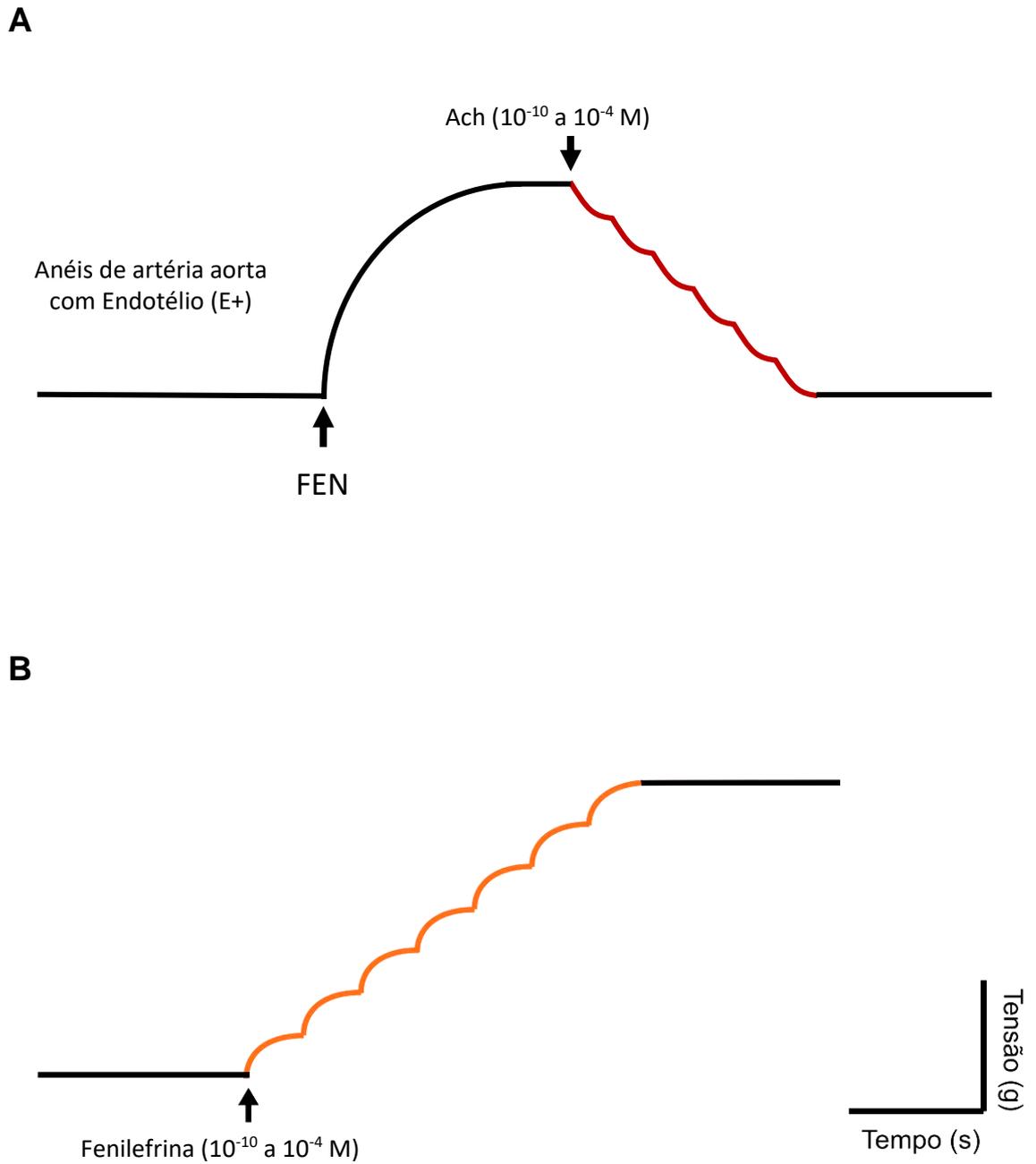


Figura 6 : Representação gráfica do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante de doses crescentes de acetilcolina (Ach, 10^{-10} a 10^{-4} M) em anéis de artéria aorta torácica com endotélio funcional, pré-contráídos com fenilefrina (FEN) (A). Representação gráfica da curva concentração-resposta à FEN (10^{-10} a 10^{-4} M) (B).

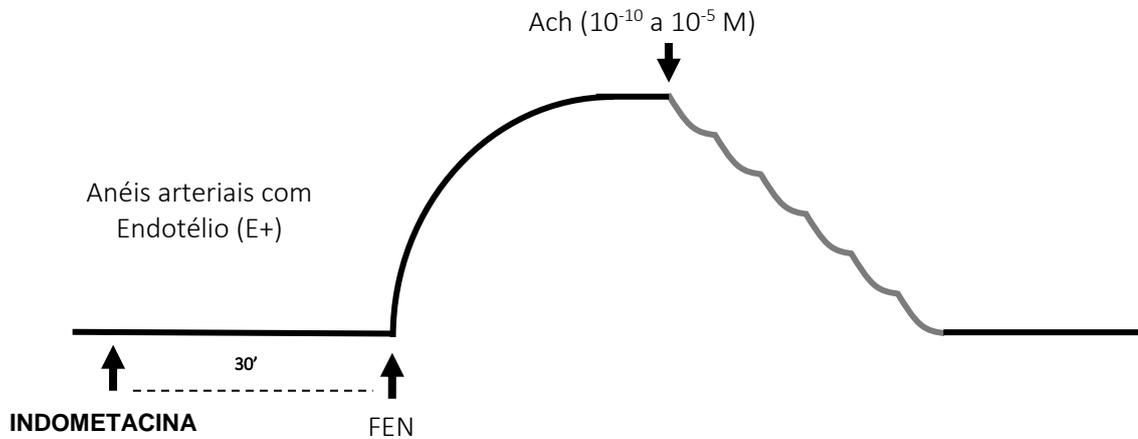


Figura 7: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação dos efeitos da indometacina (inibidor não-seletivo de ciclooxygenases) sobre o relaxamento endotélio-dependente, induzido por acetilcolina (Ach) em segmentos de artéria aorta torácica pré-contraídos com fenilefrina (FEN).

4.17 EXPRESSÃO DOS DADOS

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m). Os resultados foram analisados utilizando-se teste t de Student (pareado ou não pareado), análise de variância (ANOVA) a uma via ou duas vias, seguida pelo teste de Tukey e/ou Bonferroni quando apropriado. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. O programa GraphPad Prism™ (Version 5.01, Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) foi utilizado como auxiliar nestas análises e construção dos gráficos.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS

A análise do consumo de ingestão dietética, ao longo de 12 semanas, mostrou que os animais alimentados com DH (rica em lipídios/baixa em carboidratos) apresentaram uma ingestão (em gramas) 48% menor do que SHRs alimentados com a dieta comercial padrão ($29,6 \pm 2,0$ g DH vs. $16,4 \pm 1,0$ g controle; $p < 0,001$). O tratamento com enalapril reduziu ($p < 0,05$) o consumo (em gramas) de SHRs alimentados com a DH (Figura 8 A), assim como ($p < 0,01$) a ingestão calórica (Figura 8B).

Após o desmame (ocorrido aos 21 dias de idade), os animais de todos os grupos apresentaram peso corporal semelhante ($35 \pm 2,7$ controle; $36 \pm 1,6$ C+E; $31 \pm 1,2$ g DH; $31 \pm 1,2$ g DH+E). Porém, como pode ser observado na Figura 9, a partir da quarta semana de DH o peso corporal aumentou significativamente ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle. Ainda, o tratamento com enalapril em nada modificou a evolução corporal dos SHRs alimentados com dieta padrão. Mas, preveniu o aumento excessivo do peso corporal dos animais alimentados com a DH. Este efeito foi significativo ($p < 0,05$) a partir da quarta semana de idade (DH+E vs. DH). Observou-se também, que o peso corporal final do grupo DH + E foi 60% menor do que os ratos que consumiram a DH e não foram tratados. Ao longo das 12 semanas de tratamento, não foram observadas diferenças entre os grupos controles que receberam dieta padrão, tratados ou não com enalapril. O peso corporal corrigido pelo comprimento individual da tíbia, expressa como relação do peso corporal/comprimento da tíbia foi significativamente aumentado ($p < 0,01$; ANOVA a duas vias; Figura 10), no grupo DH. Este resultado é corroborado pelo aumento significativo ($p < 0,001$) da relação do tecido adiposo/comprimento da tíbia e da relação tecido adiposo perirrenal/comprimento da tíbia, denotando maior índice de adiposidade.

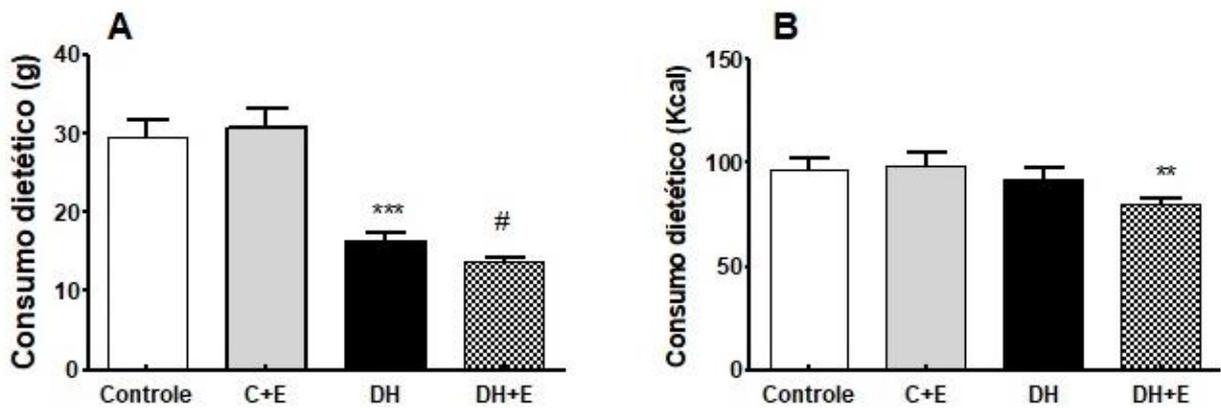


Figura 8: Efeito do tratamento com enalapril por 12 semanas de idade em gramas (A) e em calorias (B) em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Valores expressos como média \pm erro padrão da média (s.e.m). $n = 6$ a 8 ratos por grupo. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ vs controle; # $p < 0,05$ vs DH; teste t de Student não pareado.

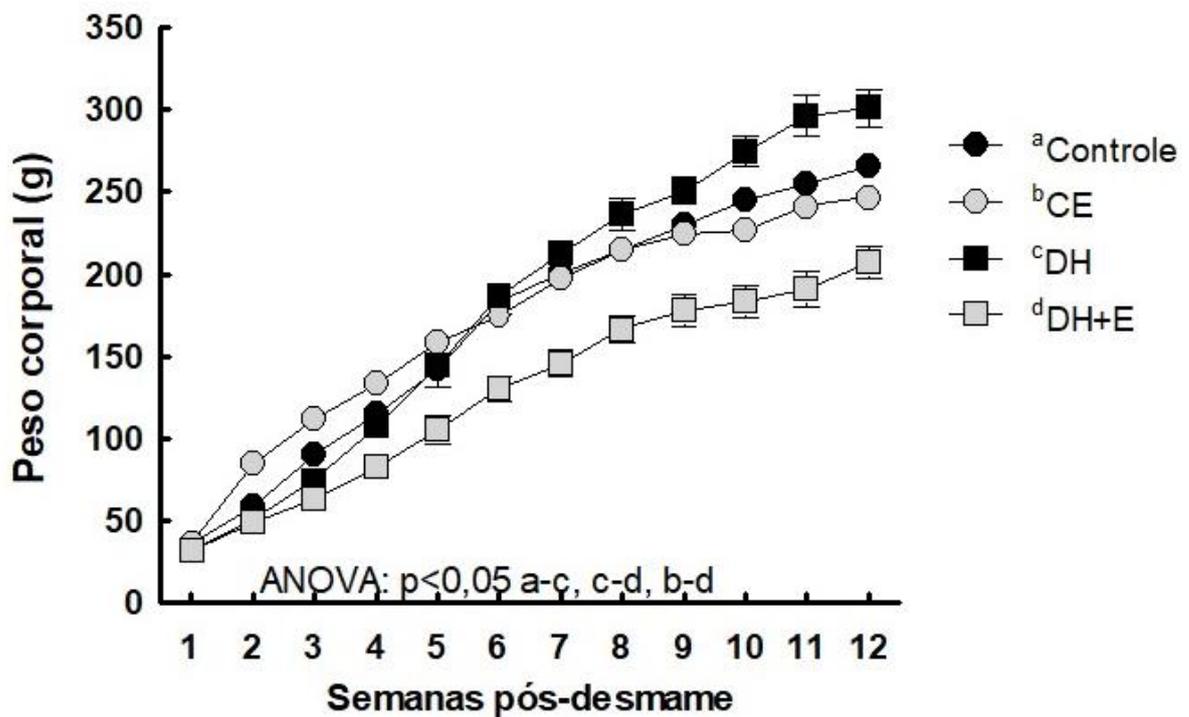


Figura 9: Efeito do uso de enalapril desde o desmame por 12 semanas de idade sobre a evolução do peso corporal de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) alimentados com dieta padrão, dieta hiperlipídica tratados ou não com enalapril. Barras verticais indicam o erro padrão da média (s.e.m). $n = 6$ a 8 ratos por grupo. * $p < 0,05$ (ANOVA a duas vias, seguida pelo teste de Tukey).

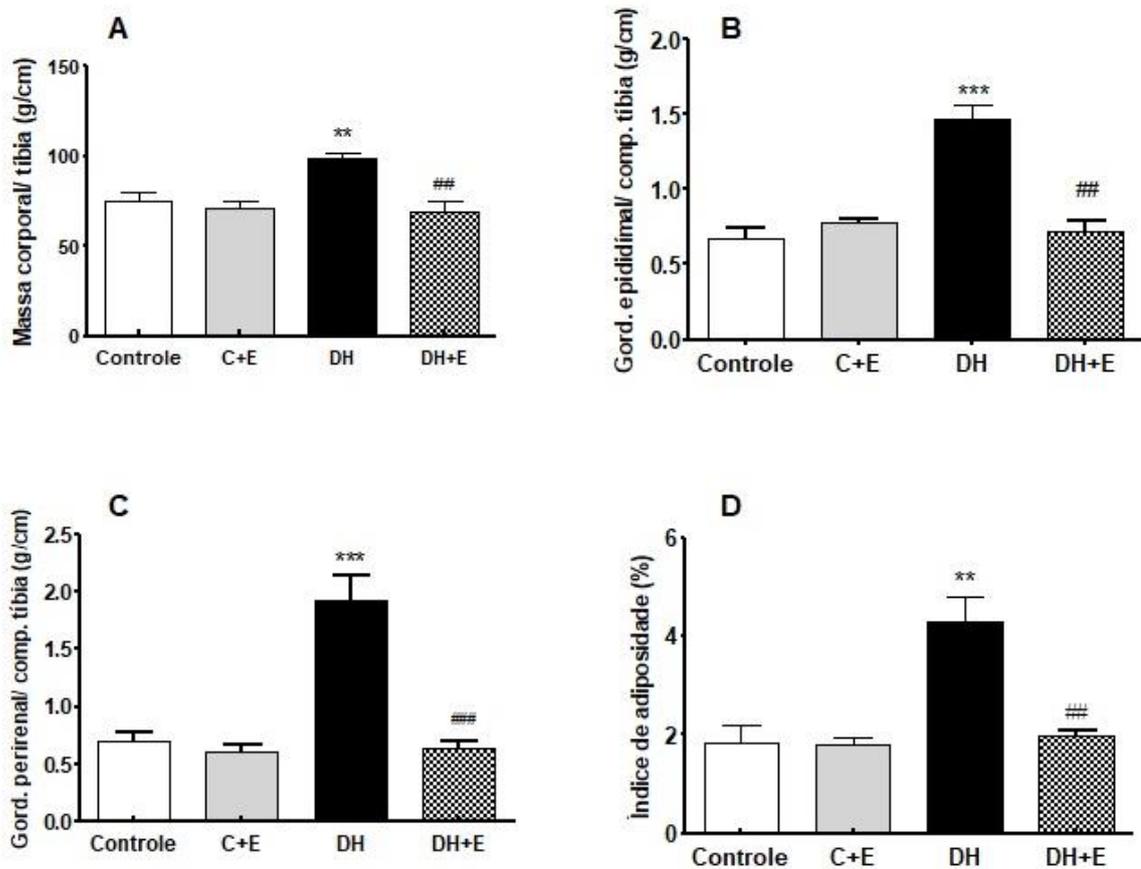


Figura 10: Efeitos do tratamento precoce com enalapril sobre a relação gordura epididimal/comprimento da tibia (A), relação gordura epididimal/ comprimento da tibia (B), relação gordura perirrenal/ comprimento da tibia (C), índice de adiposidade (D) em SHR pertencentes aos grupos: controle, C+E, DH e DH+E tratados durante 12 semanas. Valores expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.); n = 6-8 ratos por grupo. ** p < 0,01; *** p < 0,001 vs controle e ## p < 0,01, ### p < 0,001 vs DH.

5.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Ao analisar o perfil bioquímico de todos os grupos experimentais observou-se que o enalapril não alterou os valores glicêmicos de jejum do grupo alimentado com dieta padrão ($88,2 \pm 2,1$ mg/dL C+E vs. $84,4 \pm 3,1$ mg/dL, controle). Porém, a DH promoveu aumento significativo ($p < 0,05$) da glicose plasmática quando comparado com o grupo controle. Contudo, o tratamento com enalapril no grupo DH não preveniu o aumento glicêmico (Figura 11A).

Na Figura 11 B e C pode ser observado que os níveis plasmáticos de triglicérides foram similares em todos grupos, mas os níveis de colesterol total foram significativamente ($p < 0,001$) maiores no grupo DH, quando comparado ao controle ($90,0 \pm 7,0$ vs. $45,0 \pm 2,0$ mg/dL), respectivamente. O tratamento com enalapril foi capaz de prevenir o aumento do colesterol total induzido pela DH (Figura 11C).

Ademais, o consumo da dieta hiperlipídica reduziu os níveis plasmáticos de colesterol HDL no grupo DH. Similarmente ao grupo controle, o tratamento com enalapril foi capaz de promover o aumento do colesterol HDL. (Figura 11 D). Isto indica que o bloqueio do SRA melhorou o perfil lipídico dos animais que consumiram a dieta obesogênica. Como pode ser observado na Figura 12, quando foi realizado o TOTG o grupo alimentado com DH mostra menor decaimento da glicose ao longo do tempo, quando comparado ao grupo controle, nos intervalos de 30, 60, 90 e 120 minutos (Figura 12A). Isto é referendado quando se verifica a área sob a curva, que foi significativamente aumentada para o grupo DH. O tratamento com enalapril (DH+E) não melhorou a tolerância à glicose (DH +E vs. DH; (Figura 12).

O TTI, utilizado para avaliar a sensibilidade dos tecidos responsivos à insulina, determinado pela medida em que a glicose permanece na circulação ao longo do tempo após a administração da insulina, demonstrou que o grupo DH apresentou menor decaimento da glicose nos intervalos de 20 e 25 minutos, quando comparado ao controle (Figura 12B), conseqüentemente a concentração da glicose calculada como a área sob a curva (AUC) foi aumentada 1,5 vezes no DH, comparado ao controle. O tratamento com o enalapril não melhorou a sensibilidade à insulina (Figura 12D). Esses dados podem ser confirmados pela análise da constante de decaimento da glicose (KITT), onde o grupo DH mostrou menor sensibilidade à insulina em relação ao grupo controle (Figura 12E). Juntos, estes dados confirmam que o consumo desta dieta obesogênica desenvolve o quadro de RI e intolerância à glicose, que neste caso não foi prevenido pelo tratamento com enalapril.

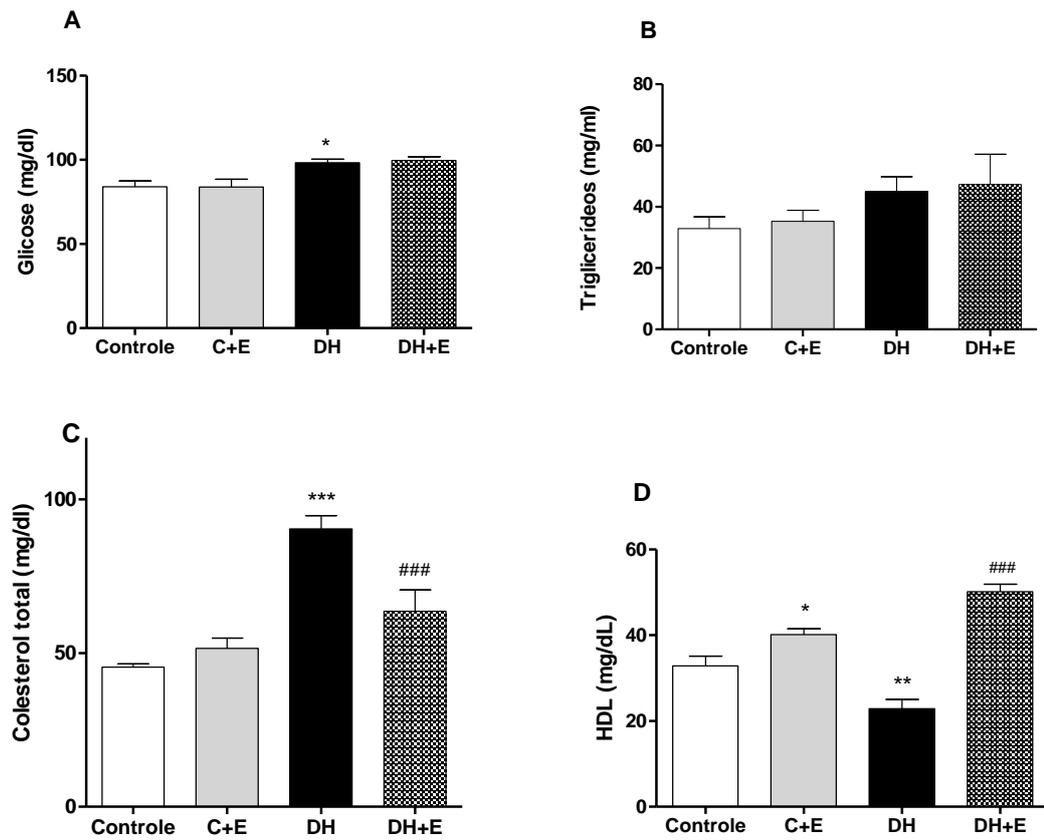


Figura 11 : Efeito do tratamento precoce com enalapril sob o perfil glicêmico e lipídico de ratos espontaneamente hipertensos pertencentes aos grupos controle, C+E, DH e DH+E, onde (A) glicose plasmática, (B) triglicerídeos plasmático, (C) colesterol total plasmático; (D) HDL-plasmático. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m., n= 6-8 ratos/grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. controle; # $p < 0,01$; ## $p < 0,001$ vs DH.

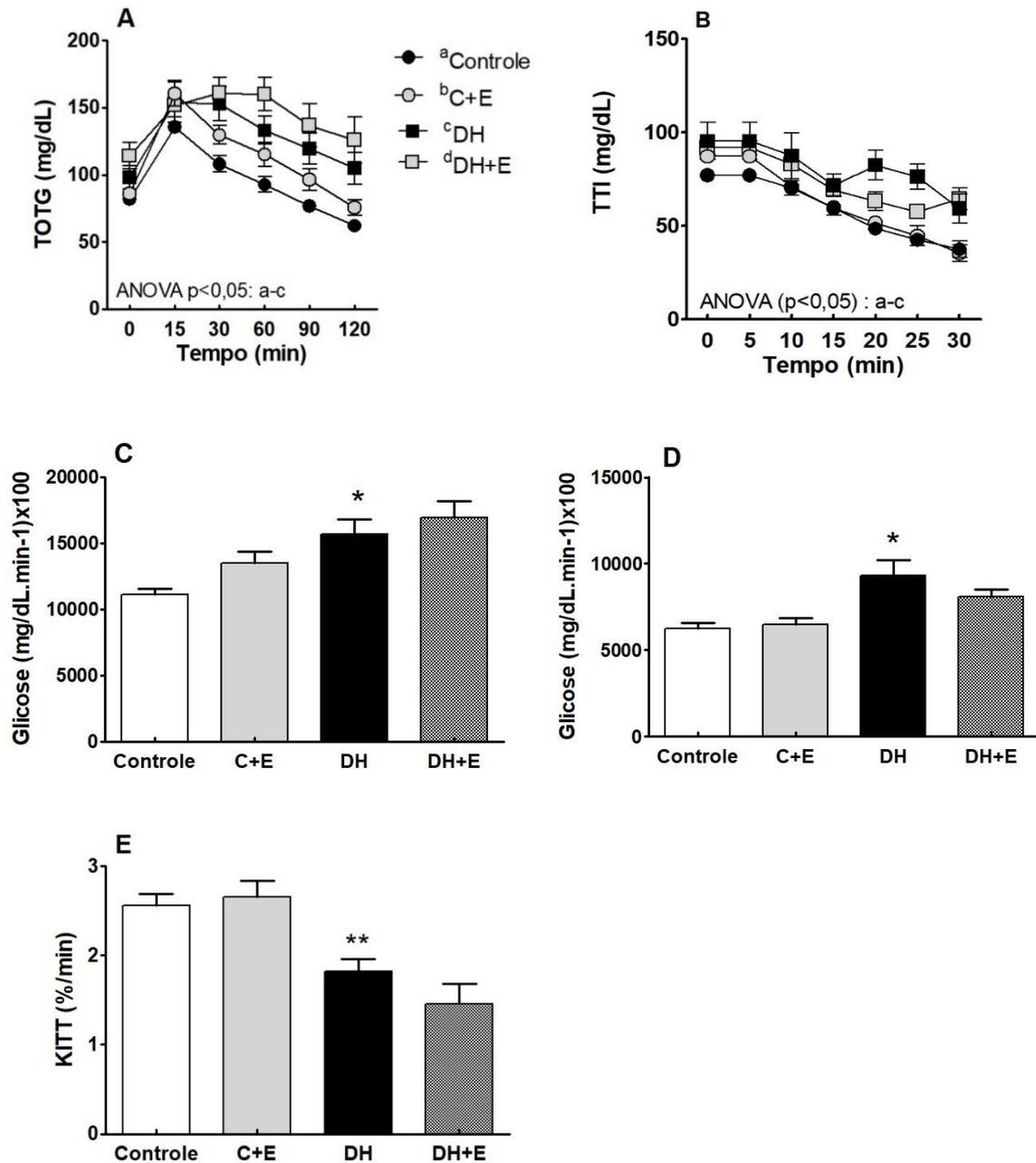


Figura 12: Efeitos do tratamento precoce com enalapril sobre o teste oral de tolerância a glicose (TOTG - A) e a insulina (TTI - B). Os painéis C e D representam as respectivas áreas sob a curva. O painel E representa a constante de decaimento de glicose (KITT) nos grupos controle, C+E, DH e DH+E. Valores expressos como média \pm e.p.m.; $n = 6-8$ por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (ANOVA a duas vias, seguida do teste de Bonferroni nos gráficos A e B) vs controle e *test t de student* nos gráficos C, D e E.

A Figura 13 A demonstra que o consumo da DH não aumentou os níveis NEFA. Entretanto, o excesso de lipídios na dieta elevou significativamente ($p < 0,001$) os níveis plasmáticos do hormônio leptina que foi atenuado pelo enalapril (Figura 13 B), muito embora não tenha alcançado os níveis do grupo controle, alimentado com a dieta padrão.

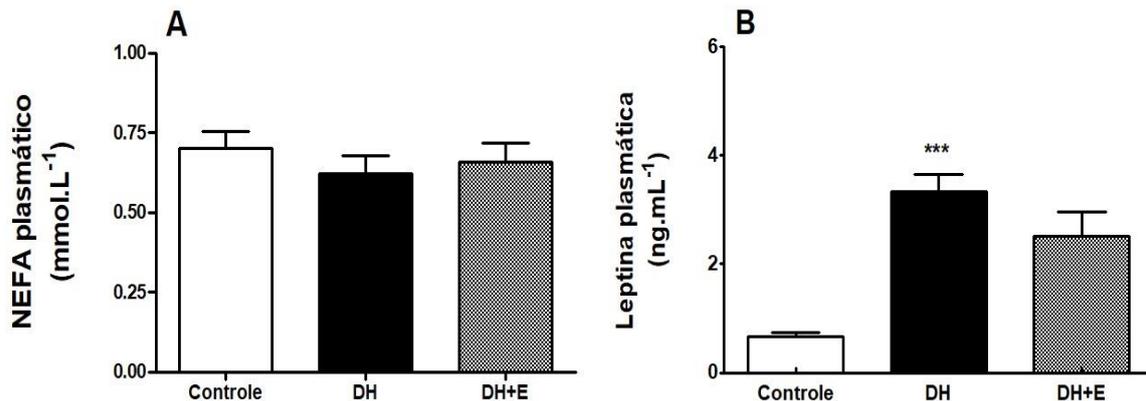


Figura 13: Efeitos do tratamento precoce com enalapril sobre os níveis plasmáticos de ácidos graxos livres (A) e leptina (B) em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) alimentados com dieta hiperlipídica durante 12 semanas. Valores expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.); $n = 6-8$ ratos por grupo. *** $p < 0,001$ (DH vs controle); seguida do teste de Bonferroni.

As DCV estão associadas com alterações das enzimas do fígado e a esteatose hepática não alcoólica é um fator independente, associado ao risco cardiovascular. Portanto, nossa hipótese era que o consumo de DH poderia induzir um estado de esteatose hepática não alcoólica. Porém, neste estudo o consumo da DH durante 12 semanas, não foi capaz de promover alterações nos estoques lipídicos encontrados no fígado (Figura 14 A), apesar dos níveis elevados de triglicérides e colesterol (Figura 14 B e C).

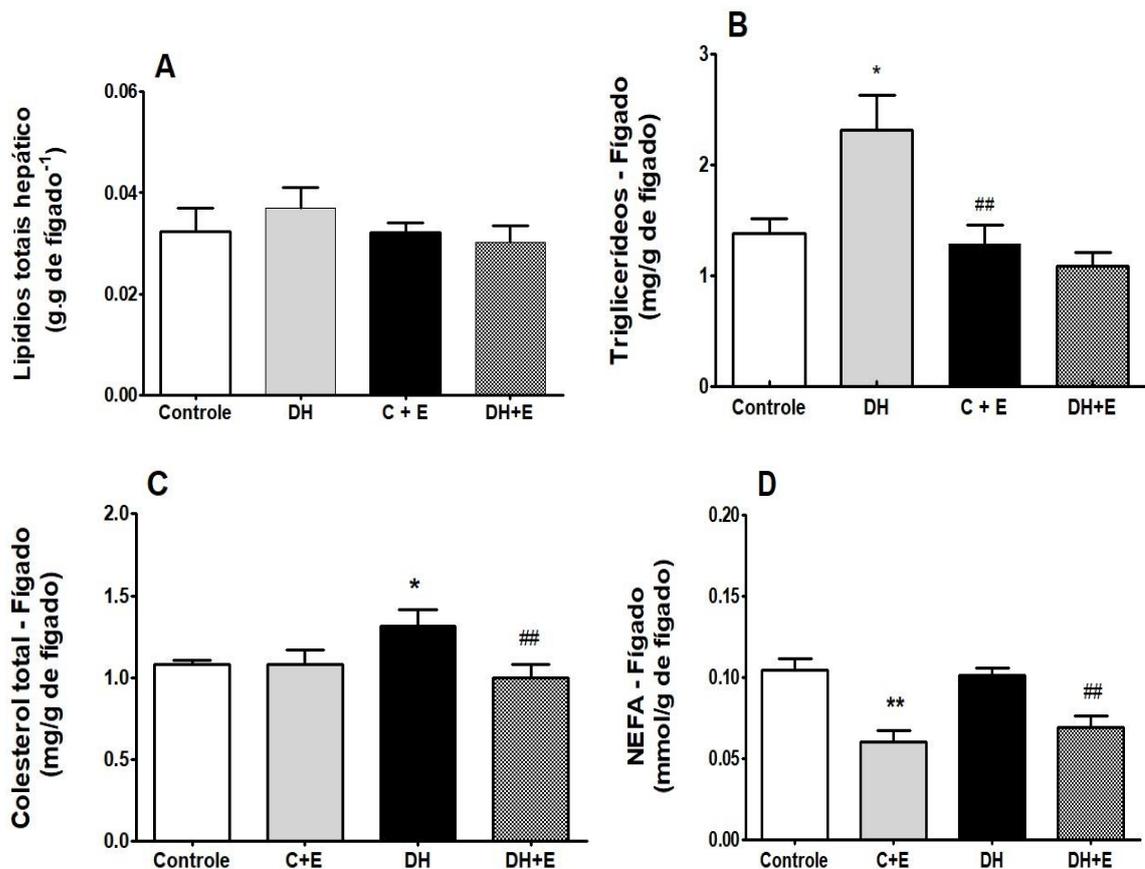


Figura 14: Efeitos do tratamento precoce com enalapril sobre o perfil lipídico hepático de ratos espontaneamente hipertenso pertencentes aos grupos controle, C+E, DH e DH+E. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs controle, ## $p < 0,01$ vs DH (ANOVA a uma via); $n = 6$ animais por grupo.

Interessantemente, o tratamento com enalapril foi capaz de prevenir o aumento tanto dos triglicérides como do colesterol (Figura 14 C) como de NEFA hepáticos (Figura 14D).

Em nível cardíaco, foi observado um aumento da produção de EROS e nitritos do grupo DH, onde o tratamento com enalapril (DH + E), preveniu a produção de EROS (Figura 15 A), mas não foi capaz de evitar o aumento dos níveis de produção de nitritos (Figura 15B). Os níveis de SOD, CAT e a relação GSG/GSSG, significativamente reduzidos ($p < 0,05$) no grupo DH quando comparado ao Controle, não foram recuperados pelo uso de enalapril (Figura 16 A, B, C).

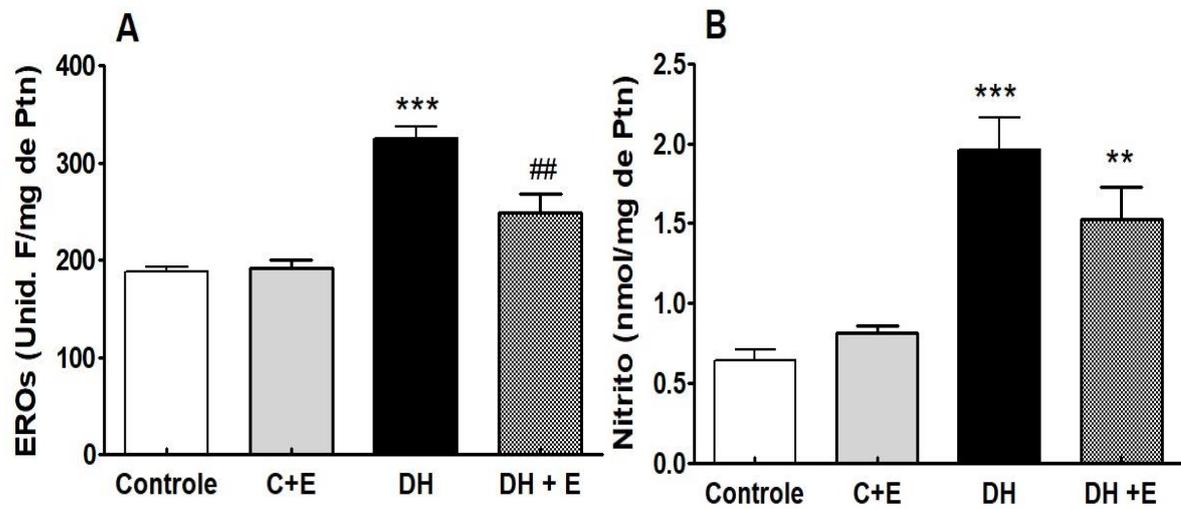


Figura 15: Efeitos do tratamento precoce com enalapril sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS)(A) e nitritos (B) no coração oriundo de ratos espontaneamente hipertensos que receberam dieta hiperlipídica durante 12 semanas. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle e ## $p < 0,01$ vs DH (ANOVA a uma via); $n = 6$ animais por grupo. Controle: ratos alimentados com dieta padrão; C + E: ratos alimentados com dieta padrão e tratados com enalapril; DH: ratos alimentados com dieta hiperlipídica; DH + E: ratos alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com enalapril.

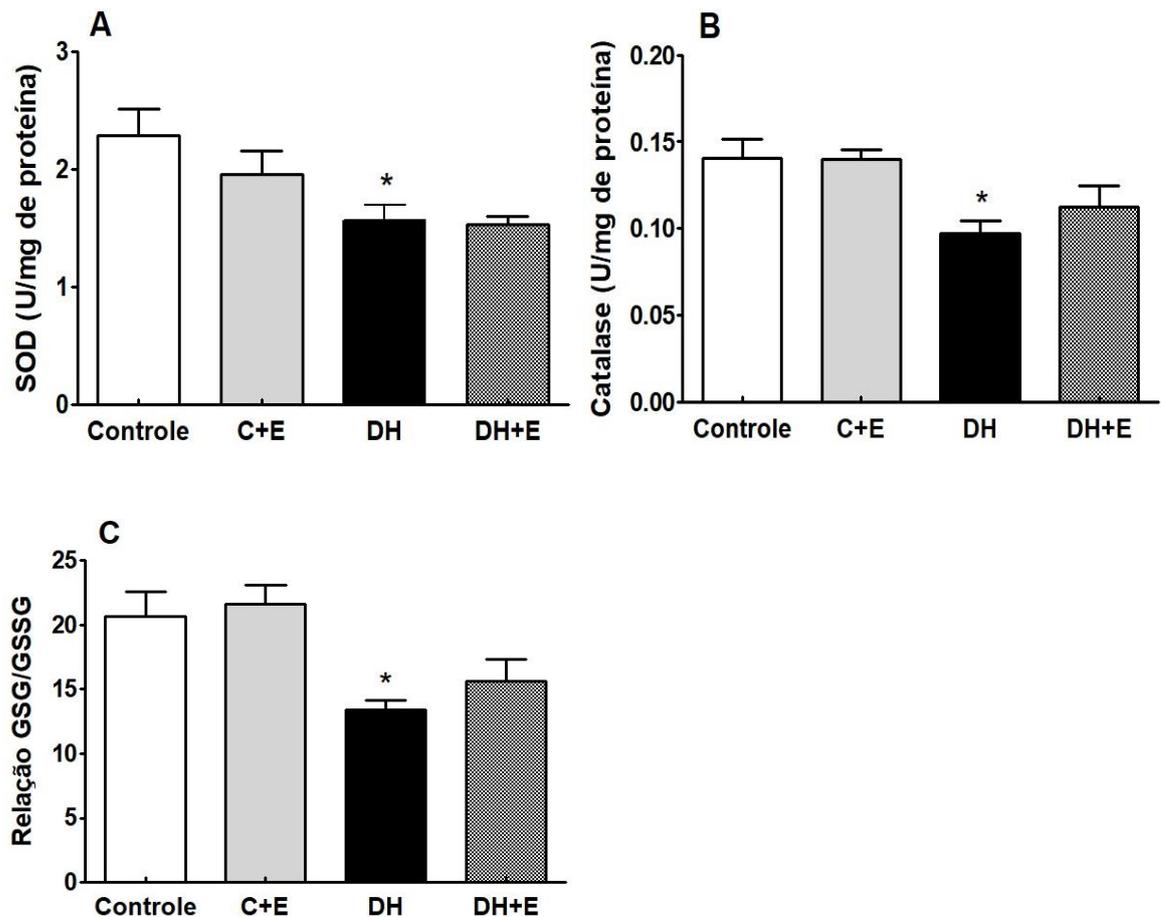


Figura 16: Efeitos do tratamento precoce com enalapril sobre os níveis cardíacos da superóxido dismutase (SOD, painel A), catalase (painel B) e a relação entre glutatona reduzida e oxidada (GSG/GSSG; painel C) em ratos espontaneamente hipertensos alimentados com dieta hiperlipídica (DH), durante 12 semanas. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ (ANOVA a uma via); $n = 6$ animais por grupo. Controle: ratos alimentados com dieta padrão; C + E: ratos alimentados com dieta padrão e tratados com enalapril, DH: ratos alimentados com dieta hiperlipídica; DH + E: ratos alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com enalapril.

Uma vez que a DH conduz a maior expressão de marcadores da inflamação, foi avaliada a expressão da Cox 1 e 2 no ventrículo esquerdo, verificando-se que os níveis, normalizado pela B-actina, da expressão proteica de Cox 1 (a Cox constitutiva) no grupo DH foi reduzida quando comparado ao controle ($p < 0,05$) e que o tratamento com o enalapril bloqueou esta redução (Figura 18A). Diferentemente do que foi observado para COX-1, o consumo da DH foi capaz de promover elevação ($p < 0,05$) da expressão da COX-2, responsável pelos processos inflamatórios. A inibição do SRA foi capaz de manter esses valores semelhantes ao

observado no grupo controle (Figura 17B). A expressão proteica de NOX-4 foi similar em todos os grupos (Figura 17C).

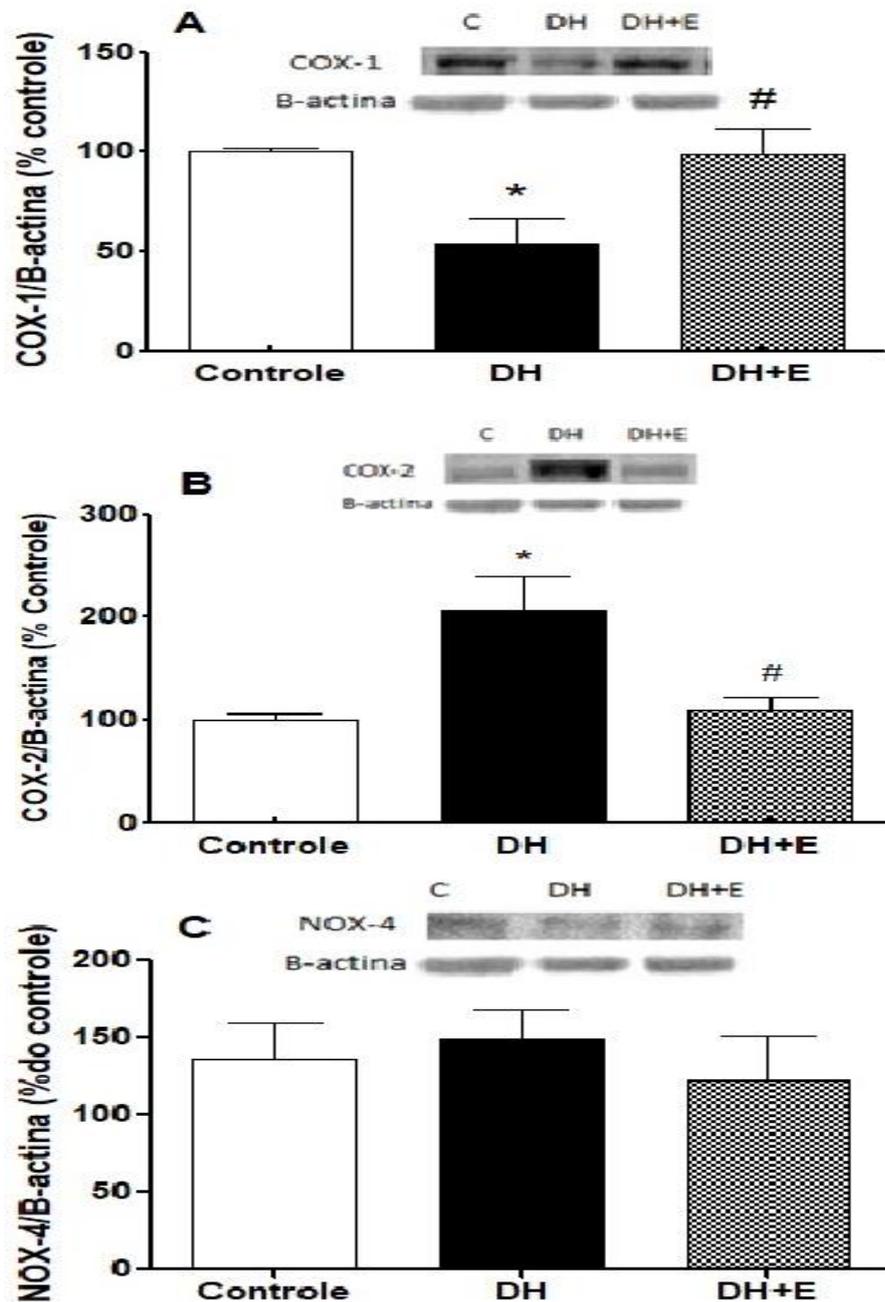


Figura 17: Efeitos do tratamento precoce com enalapril sobre a expressão proteica da ciclooxigenase 1 (A). Análise proteica da ciclooxigenase 2 (B) e do NOX-4 no ventrículo esquerdo do coração de ratos espontaneamente hipertensos com 12 semanas de idade (Figura 7C). Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m., n= 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ versus controle, # $p < 0,05$ versus DH (ANOVA a duas vias).

5.3 EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA E DO TRATAMENTO COM ENALAPRIL SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL, HIPERTROFIA CARDÍACA E O DESEMPENHO CARDÍACO IN VITRO

Os valores basais da pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e FC dos ratos hipertensos são mostrados na Tabela 1. Ao final das 12 semanas de consumo da DH, os valores de PAS foi significativamente ($p < 0,01$) elevado, quando comparado ao grupo que consumiu dieta controle (DH vs controle). Este aumento foi da ordem de 18,6%. Como esperado, o tratamento com enalapril atenuou significativamente a PAS tanto do grupo SHR controle (C + E) como do grupo DH +E. Da mesma forma, os níveis de PAM foram significativamente atenuados quando do uso de enalapril, enquanto a FC foi similar em todos os grupos, independente do tratamento com enalapril.

Tabela 1 – Efeito do tratamento precoce com enalapril sobre a pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), alimentados com dieta hiperlipídica durante 12 semanas.

	Controle	C + E	DH	DH + E
PAS (mmHg)	167 ± 6,0	138 ± 7,0*	198 ± 5,0**	156 ± 7,0##
PAD (mmHg)	94 ± 8,0	91 ± 3,0	111 ± 10,0	104 ± 7,0
PAM (mmHg)	136 ± 7,0	106 ± 3,0*	166 ± 10,0**	125 ± 6,0##
FC (b.p.m)	407 ± 13	371 ± 3,0	403 ± 12	375 ± 11

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (e.p.m.). n= 6 ratos por grupo. * $p < 0,05$ Controle vs. C + E ; ** $p < 0,01$ Controle vs. DH; ## $p < 0,001$ DH vs. DH+E (teste t não pareado) Controle: dieta padrão não tratados; C + E: dieta padrão tratados com enalapril ; DH: dieta hiperlipídica; DH +E : ratos alimentados com a dieta hiperlipídica e tratados com enalapril.

A análise da relação do peso do coração úmido (PCU)/comprimento da tíbia mostra que essa relação foi maior ($p < 0,01$) no grupo submetido à DH quando comparado ao controle não tratado, indicando uma exacerbação da hipertrofia cardíaca dos SHRs. Porém, o tratamento com enalapril preveniu o agravamento desta hipertrofia (Figura 18 A). Apesar de se tratar de animais hipertensos, observou-se que o consumo de DH não modificou a relação dos pesos úmidos dos rins direito e esquerdo normalizada pelo comprimento da tíbia (Figura 18 B e 18C).

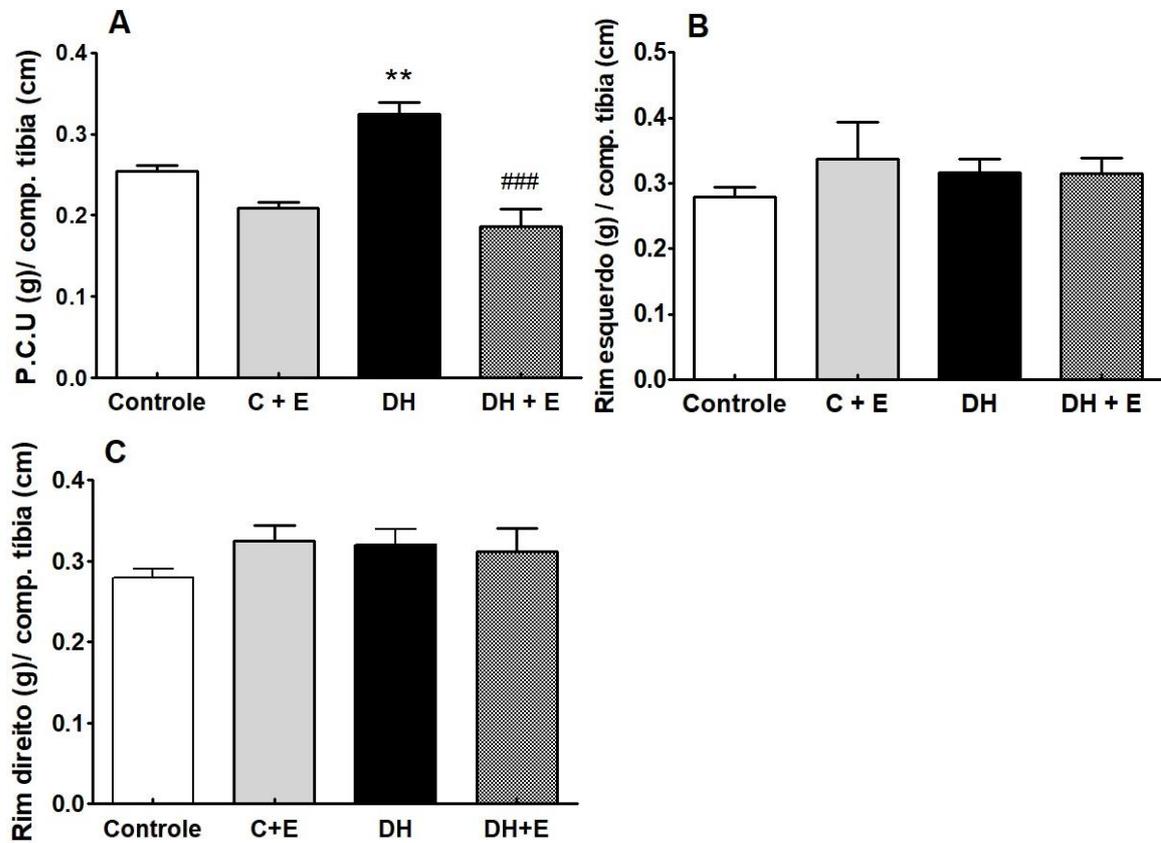


Figura 18 – A relação peso do coração úmido (PCU)/peso corporal (B) e a relação peso do rim esquerdo/ comprimento da tibia (C), peso do rim direito/comprimento da tibia (D) dos animais que receberam dieta labina (controle), dieta labina + enalapril (CE), dieta hiperlipídica (DH) e dieta hiperlipídica tratados com enalapril (DH + E). Barras verticais indicam o erro padrão da média (s.e.m); ** p < 0,01; ### p < 0,001

Como pode ser observado na Figura 19, o enalapril foi capaz de atenuar ($p < 0,05$) os níveis de ANP e BNP no grupo tratado com DH.

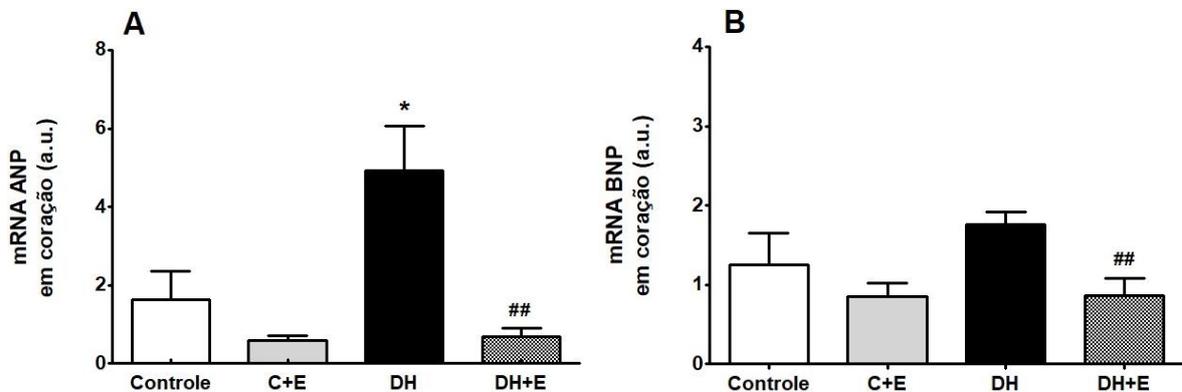


Figura 19 - Efeitos do tratamento precoce com enalapril sobre a expressão gênica do peptídeo atrial natriurético (ANP) (A) e expressão gênica do peptídeo natriurético cerebral (BNP) no ventrículo esquerdo do coração de ratos espontaneamente hipertensos alimentados com dieta hiperlipídica durante 12 semanas. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$; p^{**} 0,01 (ANOVA a duas vias); $n = 5$ animais por grupo. Controle: ratos alimentados com dieta padrão; C + E: ratos alimentados com dieta padrão tratados com enalapril; DH: ratos que receberam dieta hiperlipídica não tratados; DH + E: ratos que receberam DH, tratados com enalapril.

Em preparações de coração isolado foi observado que os valores basais da PSVE e da dp/dT_{max} foram da mesma ordem de magnitude ($p > 0,05$; teste t de Student não pareado) em todos os grupos experimentais e permaneceram estáveis durante todo período de experimentação (dados não mostrados). As infusões crescentes de ISO (10^{-12} a $10^{-4}M$) promoveram aumentos significativos ($p < 0,05$) da PSVE e dp/dT_{max} , de maneira concentração dependente (Figura 20). Em preparações do grupo DH, a PSVE em resposta a infusão de diferentes concentrações de ISO foram similares ao grupo controle. Em preparações de SHRs alimentados com a DH e tratados com enalapril, houve um aumento significativo ($p < 0,001$) da PSVE e da dp/dT_{max} , apenas na concentração de $10^{-4} M$, quando comparado ao grupo DH não tratado.

Da mesma forma, os valores basais da FC foram similares em todos os grupos. As infusões crescentes de ISO (10^{-12} a 10^{-4} M) promoveram aumentos significativos ($p < 0,05$) da FC, de maneira concentração dependente. Houve um aumento significativo ($p < 0,001$) da FC, em resposta ao ISO em concentrações de 10^{-4} e 10^{-6} M no grupo que recebeu DH e foi tratado precocemente com enalapril quando comparado ao grupo DH não tratado (Figura 21).

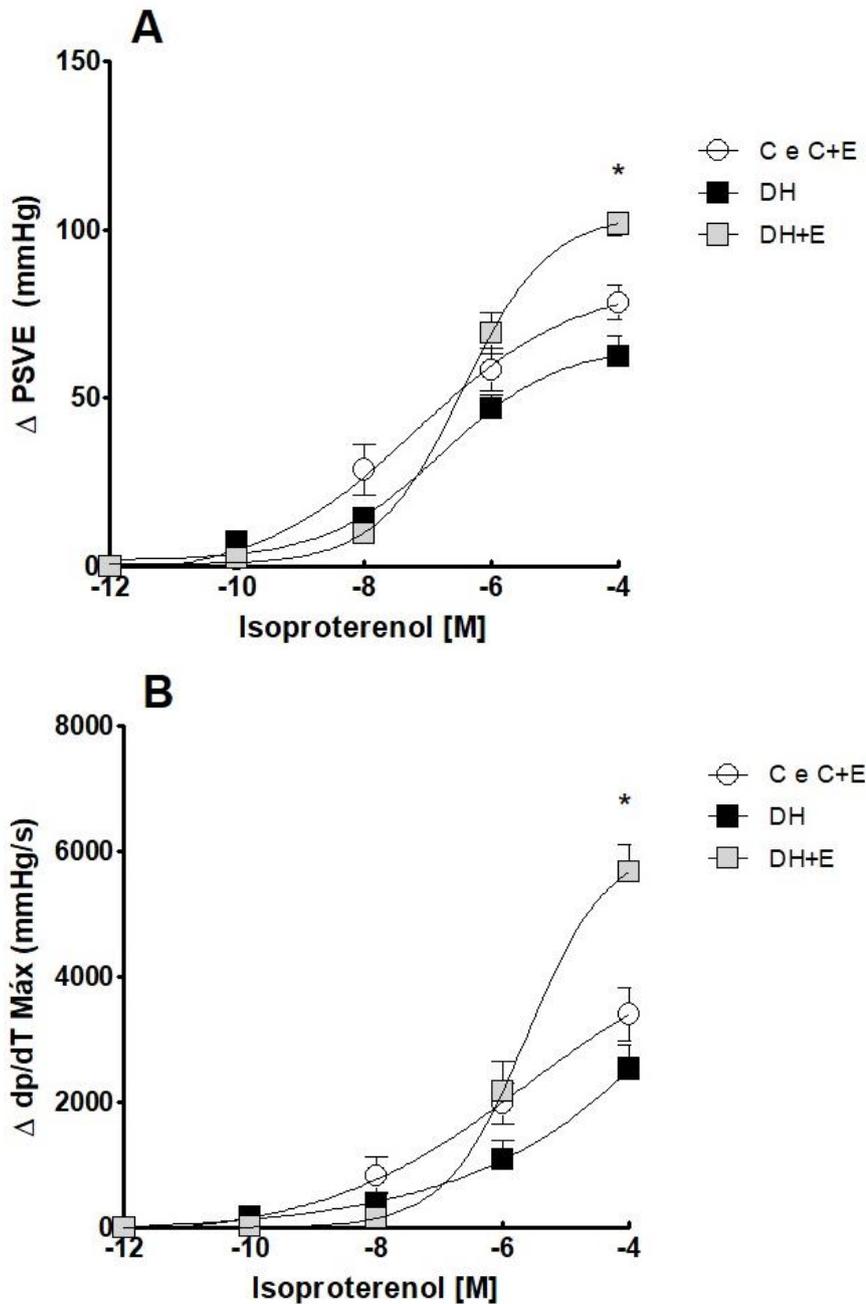


Figura 20: Variações máximas da pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE) e da dp/dT máx durante infusões (*bolus*) de concentrações crescentes de isoproterenol (10^{-12} a 10^{-4} M) em preparações de coração isolado de ratos espontaneamente hipertensos (SHRs) alimentados com dieta padrão (controle), alimentados com dieta hiperlipídica não tratados (DH) e tratados com

enalapril (DH + E). Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$; $p^{**} 0,01$ (ANOVA a duas vias, seguida do pós-teste de Bonferroni); $n = 6$ animais por grupo.

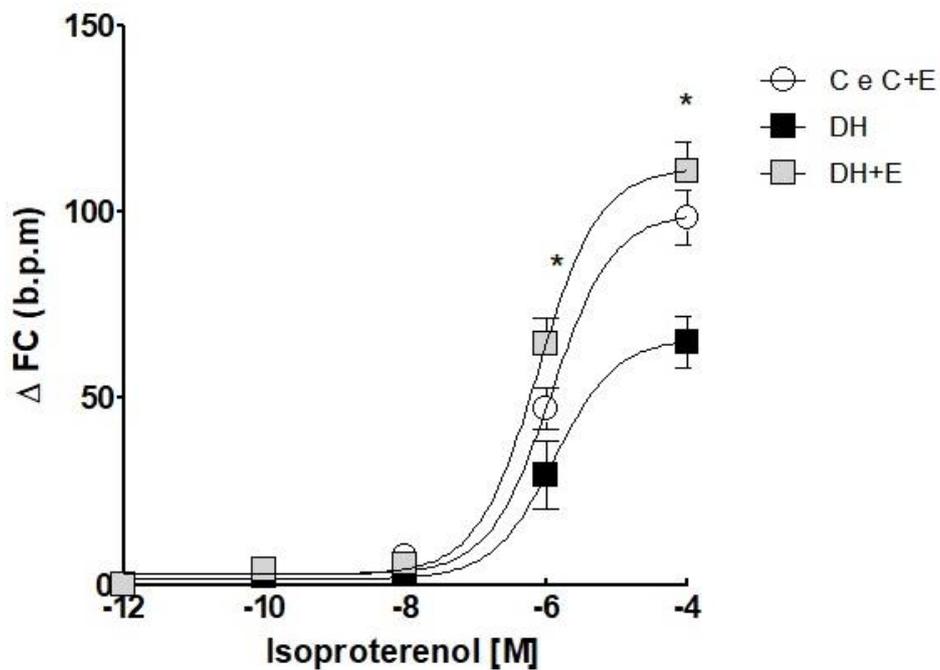


Figura 21: Variação máxima da frequência cardíaca (Δ FC) em resposta a concentrações crescentes de isoproterenol (10^{-12} a 10^{-4} M). Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$; $p^{**} 0,01$ (ANOVA a duas vias, seguida do pós-teste de Bonferroni); $n = 6$ animais por grupo. Controle: ratos alimentados com dieta padrão; C + E: ratos alimentados com dieta padrão tratados com enalapril; DH: ratos que receberam dieta hiperlipídica não tratados; DH + E: ratos que receberam DH, tratados com enalapril.

5.5 EFEITOS DO ENALAPRIL SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR EM ARTÉRIA AORTA TORÁCICA

Conforme observado na Figura 22 A, a acetilcolina foi capaz de induzir relaxamento dependente do endotélio nas preparações de aorta torácica dos grupos controle, C+E, DH e DH+E. Contudo essa vasodilatação foi reduzida no grupo DH quando comparado ao controle. O tratamento com enalapril foi capaz de melhorar o relaxamento vascular tanto no grupo controle como no grupo DH. A Figura 22 B, C e D mostra que a incubação com L-NAME, inibidor da eNOS, foi capaz de abolir o relaxamento vascular em todos os grupos experimentais tratados ou não com enalapril. Isto demonstra que em SHRs, o vasorrelaxamento é ON dependente.

A ativação dos derivados do ácido araquidônico como as ciclooxigenases está diretamente relacionada com a disfunção endotelial que é observada em na HA e DM. Portanto, nós avaliamos a participação dessa via através da incubação de anéis de aorta com indometacina (inibidor não seletivo da COX). Os resultados mostram que a inibição dessa via promoveu aumento no relaxamento vascular, dependente do endotélio, tanto no grupo controle como no grupo DH (Figura 22 E e F). Isto sugere que a disfunção endotelial presente na hipertensão associada ou não a obesidade envolve a via da COX.

A resposta contrátil induzida pela fenilefrina (agonista α -adrenérgico) foi aumentada no grupo DH quando comparada ao grupo controle. Como esperado, o tratamento com enalapril reduziu a magnitude dessa resposta (Figura 23 A). A Figura 23 B e C mostra que ao inibir a eNOS com o uso de L-NAME, há uma elevação na resposta contrátil à fenilefrina. Isto é observado em todos os grupos experimentais. A participação da via dos derivados da COX na resposta contrátil à fenilefrina também foi avaliada. Para tanto as artérias dos grupos experimentais foram pré-incubadas com indometacina, observando-se que esta foi capaz de reduzir a contração à fenilefrina em todos grupos (Figuras 23 D, E e F)

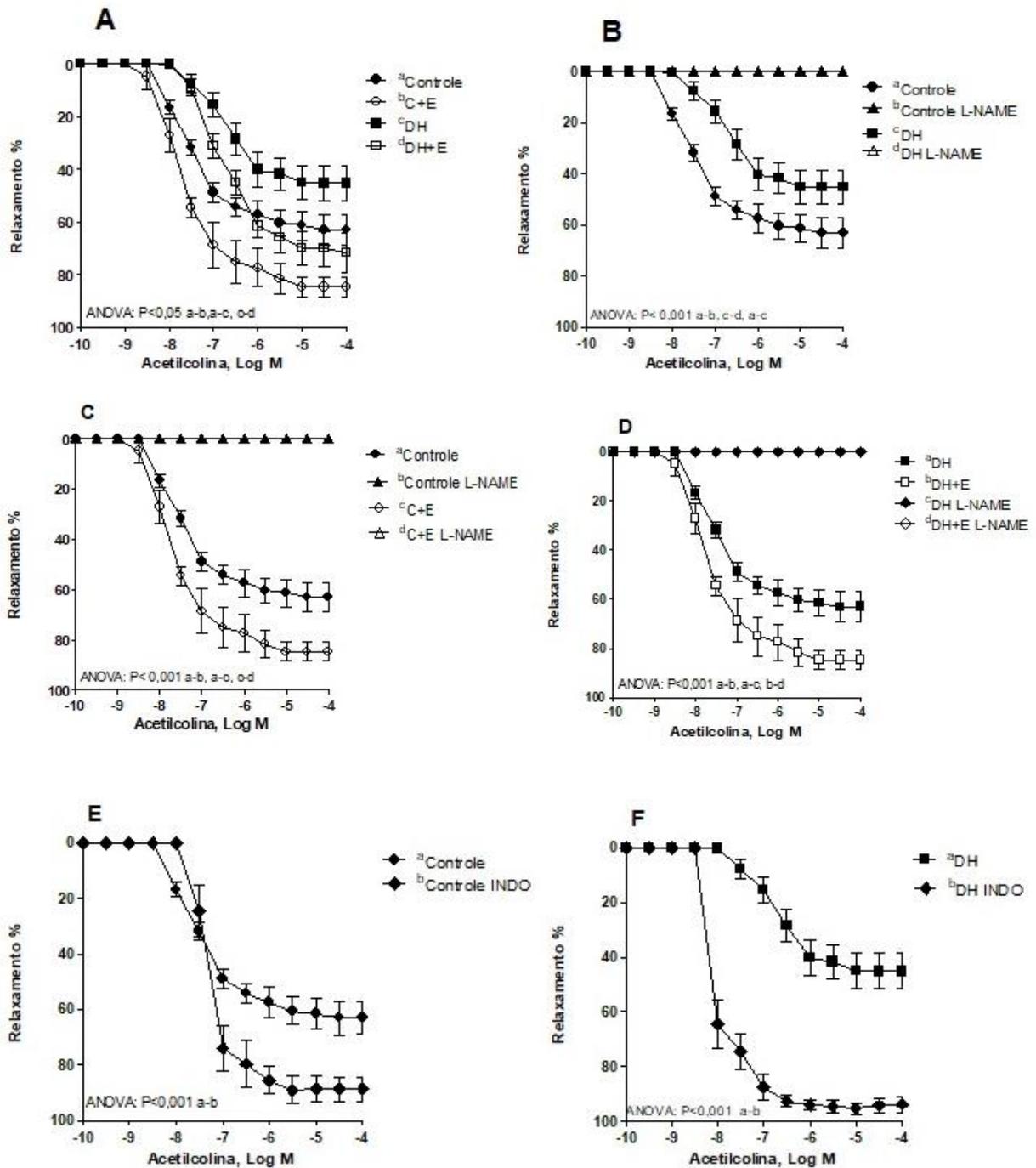


Figura 22: Efeito do enalapril sobre relaxamento vascular dependente de endotélio em anéis de artéria aorta torácica de ratos SHR dos grupos controle, C+E, DH e DH+E após 12 semanas de tratamento (A). Resposta à acetilcolina (Ach) em artérias dos grupos controle e DH na presença do L-NAME (B), resposta vasodilatadora da Ach nos grupo controle e C+E na presença do L-NAME (C), resposta à acetilcolina nos grupos DH e DH+E na presença da acetilcolina (D), relaxamento vascular no grupo controle na presença da indometacina (E) e resposta à Ach em artérias do grupo DH incubadas com INDO. Os resultados são expressos como média \pm e.p.m. * p <0,05 (ANOVA a duas vias); n = 5 animais por grupo

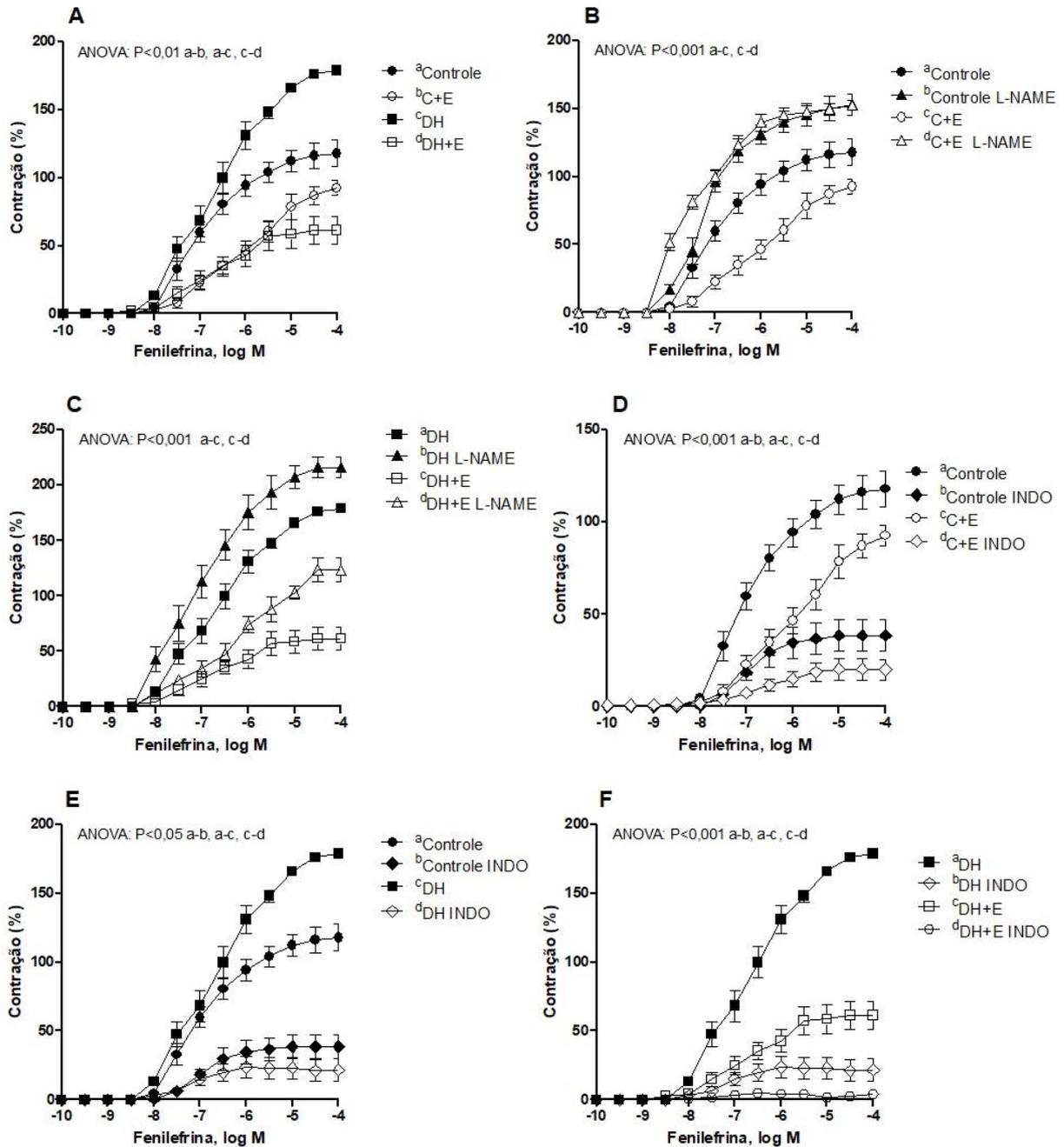


Figura 23: Efeito do enalapril sobre a curva dose resposta a fenilefrina (FEN) em doses crescentes em anéis de artéria aorta torácica de SHR. Resposta contrátil a fenilefrina nos grupos controle, C+E, DH e DH+E após 12 semanas de tratamento (A), resposta contrátil em artérias dos grupos controle e C+E na presença do L-NAME (B), contração arterial à FEN nos grupo DH e DH+E na presença do L-NAME (C), contração induzida pela FEN nos grupos controle e C+E em anéis de aorta incubado com indometacina (D), contração à FEN em aorta dos grupos controle e DH na presença da INDO, grupo controle na presença da indometacina (E) e resposta à FEN em artérias do grupo DH e DH+E incubadas com INDO. Os resultados são expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ (ANOVA a duas vias); $n = 5$ animais por grupo.

6 DISCUSSÃO

Hipertensão associada à obesidade e SM tem emergido como um fator crítico no desencadeamento de insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada e disfunção diastólica (GROSMAN, 1991; SCHILLACI *et al.*, 2004), em que o SRA pode exercer um papel chave. Todavia, poucos são os estudos que investigam o uso de IECA em fases precoces da vida em modelos de HA associada a obesidade. Portanto, nós investigamos se o tratamento com enalapril durante 12 semanas, iniciado na terceira semana de idade evitaria os prejuízos causados pela HA associada ao consumo de uma dieta rica em lipídios e baixa em carboidratos, observando-se que a dieta, por si só, desencadeia efeitos deletérios que conduzem a maior adiposidade, exacerbação dos níveis pressóricos, alterações na função cardíaca e disfunção endotelial em jovens SHRs (15 semanas de idade). Evidências experimentais têm associado o consumo de diversos tipos de dietas hiperlipídicas à obesidade e SM (BUETNER *et al.*, 2007; NUNES-SOUZA *et al.*, 2016; SHIOU; HUANG; LIN; LEE, 2018). Todavia, vão em sentido oposto àqueles que questionam o prejuízo causado pelo consumo da DH com baixo teor de carboidrato e reportam efeitos benéficos (DUDA *et al.*, 2008; BOSSE *et al.*, 2013). Apesar do consumo calórico dos SHRs alimentados com DH ser idêntico aos que consumiram a dieta padrão, verificou-se um aumento na expressão gênica dos marcadores para hipertrofia cardíaca, peptídeo natriurético atrial (ANP) e peptídeo natriurético cerebral (BNP) que aceleram a exacerbação da hipertrofia cardíaca, que nesta linhagem costuma aparecer entre 6 e 24 meses de idade. O ANP normalmente é expresso nos átrios e ventrículos durante o desenvolvimento embrionário e fetal, sendo utilizado como marcador de formação cardíaca. Este peptídeo é regulado pelo gene *Nppa*, cuja expressão é reduzida após o nascimento, mas em situações patológicas sua expressão é elevada contribuindo diretamente para a hipertrofia cardíaca e infarto do miocárdio (HORSTHUIS *et al.*, 2008). Neste caso o consumo de uma dieta rica em lipídios pode ser o insulto adequado para manifestação destes peptídeos.

As características de diversas dietas hiperlipídicas que induzem obesidade em ratos e camundongos, envolvem dislipidemia, RI e intolerância à glicose, mas não DM (SUN *et al.*, 2014). Este é um ponto controverso na literatura, pois quando se

trata de programação fetal, quando ocorre exposição à DH nas fases de gestação e lactação, aumenta a susceptibilidade para doenças metabólicas. A hiperglicemia aumenta a possibilidade de RI e o aparecimento do DM 2, possivelmente devido a alteração da função pancreática (CER *et al.*, 2005; HAN *et al.*, 2005, OHTA *et al.*, 2017). Os resultados encontrados por nós, de fato comprovam que ocorre intolerância à glicose e intolerância à insulina, aumento dos níveis de colesterol, mas não de triglicérides plasmático. Embora, tenha sido mostrado um aumento de triglicérides e colesterol hepático. Um fator limitante nesta discussão é a ausência dos dados histológicos que poderiam esclarecer a presença ou não de fibrose hepática, e que a esteatose hepática não alcoólica é um fator independente associado ao risco cardiovascular. Ademais, os níveis de NEFA foram prevenidos pelo tratamento precoce com enalapril, tanto nos SHRs controle como nos submetidos a DH. Neste contexto, é considerado que o excesso de NEFA em nível hepático contribui para alterações metabólicas com aumento na gliconeogênese e promove fosforilação dos resíduos de serina nos receptores de insulina, que leva inibição das vias de sinalização da insulina (KARPE *et al.*, 2011).

Embora, haja um aumento discreto nos níveis de glicemia dos animais ora estudado, não consideramos um dado relevante, visto que este aumento foi de 16 mg/dL e não atingiu níveis fora da faixa de normalidade. Os testes de TTG e TTI em conjunto aqui realizados confirmam os resultados observados no perfil bioquímico destes animais, onde o consumo da DH aumentou os níveis glicêmicos, sem que desencadeasse uma franca hiperglicemia. Neste sentido, outros autores têm mostrado que distúrbios da homeostase parecem ser mais severos em camundongos do que em ratos, portanto é comum os camundongos desenvolverem diabetes (MACHADO, SHIMIZU; SAITO, 1994) e os ratos apresentarem RI sem hiperglicemia (MORI *et al.*, 2008). Outros autores não observaram alterações nas concentrações plasmáticas de colesterol total e triglicérides, embora as concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres fossem maiores quando comparadas aos SHRs alimentados com dieta padrão (CHUNG *et al.*, 2010). Evidências recentes obtidas por nossa equipe mostram que a DH utilizada durante o período gestacional ou apenas durante a fase adulta (6 a 8 semanas), em ratos Wistar, induziu um excessivo acúmulo de tecido adiposo e distúrbios metabólicos que se assemelham ao estado pré-diabético em humanos e evoluiu para alterações

vasculares. A substituição dessa dieta por uma dieta balanceada (“chow”) sugere que a sensibilidade à insulina é primariamente dependente dos níveis elevados de lipídios contidos na dieta e pode ser revertido (manuscrito em revisão). Anteriormente, nós observamos que em SHR a exposição à DH durante o período de gestação e lactação não foi capaz de promover alterações nos perfis de colesterol e glicemia das proles aos 6 meses de idade, mas aumentou os níveis de triglicérides e os marcadores de estresse oxidativo, o que possivelmente se associa a disfunção endotelial encontrada nesses animais. Ademais, a obesidade visceral apresentada pelos animais alimentados com DH pode estar relacionada ao aumento da produção de EROs, citocinas pró-inflamatórias e lesão vascular que contribuem para a diminuição da biodisponibilidade do ON, potente vasodilatador. Há dados na literatura que mostram o envolvimento das espécies reativas de oxigênio na hipertrofia cardíaca, com um papel importante de EROS na via de sinalização que regula a expressão gênica que leva ao dano celular (MORIS *et al.*, 2017). Ademais, a obesidade está diretamente relacionada com o aumento da inflamação sistêmica e do estresse oxidativo -caracterizado como um desbalanço entre as defesas antioxidantes e aumento dos radicais livres (NATOLI *et al.*, 2018). A cadeia transportadora de elétrons das mitocôndrias é amplamente conhecida como principal local de produção de EROs dentro do sistema cardiovascular, ocorrendo aumento na produção de O_2^- (WEN, GWATHMEY, XIE, 2012). Nesse contexto, a ANG II por meio da ativação receptores AT1, promove aumento na produção de EROs através de cascatas enzimáticas que estão ligadas ao aumento da peroxidação proteica e lipídica com formação de peroxinitrito ($ONOO^-$) (COOPER *et al.*, 2007). Entretanto, há dados discordantes na literatura, por exemplo, estudos realizados em ratos da linhagem Wistar, alimentados com DH (60% de lipídios), durante 11 semanas, não mostraram aumento na produção de ânions superóxido e nem alteração da fluidez em membranas de mitocôndrias (TOGO, KONARI, TSUKAMOTO, KIMOTO, *et al.*, 2018). Entretanto, o estresse oxidativo está implicado em várias doenças relacionadas a desordens metabólicas, onde é comum a redução das enzimas antioxidantes como SOD, catalase e as glutations. Neste estudo o consumo da DH, durante 12 semanas, reduziu a atividade das principais enzimas antioxidantes. A SOD juntamente com as glutations desempenham a função de promover a remoção do peróxido de hidrogênio no organismo catalisando sua quebra em água e oxigênio, contudo em situações patológicas como na obesidade, onde há produção

excessiva de radicais livres, este sistema antioxidante perde sua função. A ativação dos receptores AT1 além de promover aumento do estresse oxidativo e RI, está relacionada a redução da atividade da catalase. Entretanto, mesmo com a inibição da ECA pelo enalapril, o sistema antioxidante foi afetado pela DH, em nosso estudo. Embora, não deve deixar de ser considerado que o estresse oxidativo elevado em obesos é reduzido pela simples perda de peso (KELLY *et al.*, 2016).

O desenvolvimento da HA é um dos riscos do aumento de massa corporal, neste estudo os níveis pressóricos se elevaram com o consumo da DH, aumentando em 18,6% a PAS. Ressalta-se que a hipertensão desenvolvida pelos SHRs aos 4 meses é moderada, mas quando esses animais foram alimentados com a DH passou ao estágio de severa (PAS \geq 180). Esses níveis pressóricos podem conduzir a um quadro de insuficiência cardíaca com redução da contratilidade e da resposta beta-adrenérgica. Esta última consequente ao aumento da atividade simpática que leva a dessensibilização de receptores β -adrenérgicos cardíaco. No coração, é conhecido que a RI e o excesso de ácidos graxos livres - são responsáveis pela disfunção da contratilidade (THACKERAY *et al.*, 2011). O tratamento com o inibidor da ECA, enalapril, antes mesmo da instalação do quadro de hipertensão e de sobrepeso, promoveu uma redução de 40 mmHg da PAS e da PAM, mas essa redução não foi suficiente para atingir os níveis de normotensão. Mas, nós mostramos que a resposta inotrópica e cronotrópica à estimulação beta-adrenérgica, é melhorada quando os SHRs alimentados com a DH foram tratados precocemente com enalapril.

Há relatos de que o tratamento de SHRs com enalapril poderia corrigir simultaneamente a hipertensão, RI e disfunção endotelial por reequilibrar a produção de mediadores vasoativos estimulados pela insulina. De fato, o grupo que consumiu a DH durante 12 semanas e não foi tratado com enalapril, além de sobrepeso apresentaram intolerância à glicose e RI, conforme já mencionado. Outros autores demonstraram que SHRs tratados com losartana (um bloqueador de receptores AT1), através de uma minibomba subcutânea reduziu a PAS, porém essa redução é discreta (em torno de 10mmHg) mas mantida mesmo após 64 semanas em que seu uso foi cessado (BAUMAN *et al.*, 2007).

A administração de enalapril, durante o desenvolvimento pós-natal, antes da instalação do quadro de hipertensão em SHRs, até a vida adulta preveniu o aumento

da massa corporal, atenuou o quadro de hipertrofia cardíaca agravado pelo consumo de DH, melhorou o desempenho cardíaco e a disfunção endotelial em SHRs. A redução de massa corporal observada na evolução do crescimento nos animais tratados com enalapril, que culmina no grupo que recebeu a DH com redução de 60%, é de grande relevância, pois esse IECA é um dos mais utilizados no tratamento da HA e nossos dados confirmam a perspectiva para o uso na obesidade. Masuo e cols. (2001) relatam esta redução de peso corporal em pacientes hipertensos obesos, observação que é confirmada experimentalmente por Santos e cols. (2008) em ratos normotensos.

A atenuação da hipertrofia cardíaca, em SHRs que consumiram a DH, tratados com enalapril, é corroborada pela redução dos níveis de ANP e BNP – marcadores de hipertrofia cardíaca. Este resultado está em acordo com os achados de Patel e colaboradores (2018), utilizando o ramipril (um IECA). É conhecido que o aumento da atividade do SRA exerce um papel importante no desenvolvimento da hipertrofia ventricular esquerda, sendo mostrado uma correlação entre a atividade da renina plasmática e a massa ventricular esquerda. Há evidências de que fármacos que agem sobre o SRA têm efeitos específicos sobre a hipertrofia ventricular, que parece independente da redução de pressão arterial (RUILOPE e SCHMIEDER, 2008; PATEL *et al.*, 2017). O aumento da hipertrofia cardíaca encontrada no grupo que recebeu a DH e não foi tratado com enalapril se coaduna com o início da disfunção cardíaca, demonstrada pela redução da resposta inotrópica ao ISO em concentrações elevadas, encontrada nos experimentos com coração isolado. Deve-se considerar que níveis elevados de pressão arterial coexistem com elevação de catecolaminas que induz dessensibilização e *down-regulation* dos receptores beta-adrenérgicos com alterações na sinalização pós-sináptica (LEFKOWITZ, 1998). Nossos dados confirmam que a DH causa prejuízo no desempenho cardíaco, agravado neste caso pela HA e que o enalapril é capaz de atenuar ou reverter esses efeitos.

A hipertensão crônica promove remodelagem e disfunção endotelial que em SHRs deve-se primariamente a ativação do SRA que contribui diretamente para o aumento na produção de EROS que podem atuar na eNOS e reduzir a produção do ON, este quadro é agravado na presença da obesidade. Portanto, era necessário verificar se o tratamento com enalapril antes mesmo do aparecimento do quadro de

hipertensão nestes animais, os protegia deste efeito deletério. Seguramente, o quadro de disfunção foi melhorado e isto se deve, pelo menos em parte, a redução do estresse oxidativo, expressa com melhora no relaxamento dependente de endotélio. O relaxamento nos SHR possivelmente seja dependente de eNOS.

Hipertensão e obesidade estão associadas a anormalidades vasculares, tais como disfunção endotelial, aumento da resposta vasocontrátil e o remodelamento vascular (BRANDES *et al.*, 2014; TOUYZ *et al.*, 2018). Diversos autores têm relacionado estas alterações dos componentes vasculares a maior ativação do SRA, o qual contribui com o aumento do estresse oxidativo, menor biodisponibilidade do ON e maior produção dos derivados da via do ácido araquidônico, como o tromboxano A2 e COX-2. (KNIGHT *et al.*, 2008; IANTORNO *et al.*, 2014; PRIETO *et al.*, 2014). É importante destacar que a disfunção endotelial resulta inicialmente da redução da biodisponibilidade do ON (BRANDES *et al.*, 2014). Neste estudo, a exposição crônica (12 semanas) dos animais a uma dieta hiperlipídica (grupo DH) resultou em prejuízo na resposta vasorrelaxante-dependente do endotélio à acetilcolina. Por sua vez, o tratamento com um inibidor da ECA, o enalapril, atenuou os prejuízos no relaxamento vascular observados na hipertensão associada ou não a presença de uma dieta rica em lipídios. Na aorta de ratos, o ON é um dos principais agentes vaso relaxantes (ZYGUMUNT *et al.*, 1995). Neste protocolo, curvas dose-resposta na presença de um inibidor da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), não apenas aboliu o relaxamento vascular induzido por acetilcolina, como potencializou a resposta vaso contrátil a fenilefrina em ambos os grupos experimentais. Por outro lado, HA e obesidade são comumente relacionadas ao aumento da contratilidade das células do músculo liso vascular (YAMAWAKI, 2011; GOULOPOULO; WEBB, 2014). Os resultados obtidos neste estudo demonstram que o consumo da DH induziu maior contratilidade da aorta, quando comparada ao controle. Por sua vez, o tratamento com enalapril atenuou esta resposta em ambos os grupos, expostos ou não a dieta rica em lipídios. O aumento do estresse oxidativo, bem como a RI, promovidos pela obesidade e pela HA, estão associadas à disfunção endotelial, aumento da resposta contrátil à fenilefrina devido ao aumento da produção da COX-2, via ativação do SRA (HADDOCK *et al.*, 2011). O aumento da expressão de COX-2 tem sido relacionado à inflamação vascular (FÉLÉTOU *et al.*, 2009). Para investigar os efeitos das COXs na aorta de animais SHR expostos a uma dieta hiperlipídica, as artérias foram pré-incubadas com um inibidor não-seletivo

das COXs, a indometacina. Os nossos dados indicam que a inibição desta via, bem como a inibição do SRA, resultou em maior relaxamento vascular e atenuação da resposta contrátil, em ambos os grupos experimentais. Contudo, os mecanismos envolvidos nestes achados não estão totalmente elucidados.

7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo, demonstraram que a dieta rica em lipídios promoveu aumento do peso corporal com um quadro de RI e intolerância à glicose, aumento do estresse cardíaco que agravou o quadro de hipertrofia cardíaca e antecipou a disfunção cardiovascular encontrada em animais hipertensos. Entretanto, o tratamento com enalapril administrado precocemente, desde o desmame até a vida adulta, foi capaz de atenuar ou impedir esses efeitos deletérios, melhorando os níveis pressóricos e a disfunção vascular. Os efeitos induzidos pelo enalapril neste estudo corrobora a importância do SRA neste modelo de hipertensão genética associado ao consumo de dieta obesogênica. Estes resultados suportam a ideia de que o enalapril é potencialmente benéfico no quadro de obesidade.

REFERÊNCIAS

- ABADIR, P.M.; CAREY, R.M.; SIRAGY, H.M. Angiotensin AT2 receptors directly stimulate renal nitric oxide in bradykinin B2-receptor-null mice. **Hypert.**;v. 42: p.600–604, 2003.
- ABBAS, G.; SILVEIRA, M.G.; LINDOR, K.D. Hepatic fibrosis and the renin-angiotensin system. *Am J Ther.* , v.18(6):e202-8, 2011.
- AHMAD, S. *et al.* Primacy of cardiac chymase over angiotensin converting enzyme as an angiotensin-(1–12) metabolizing enzyme. **Biochem. Biophys.Res. Commun.** V. 478 (2), p.559–564, 2016.
- AITMAN, T.J. *et al.* Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. **Nat Genet.**, v. 21(1), p.76-83, 1999.
- ÁLVAREZ, Y. *et al.* Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats, **J Pharmacol Exp Ther**, v. 321, p. 381–388, 2007.
- AL-HARBI, M.M. *et al.* The effect of maternal administration of enalapril on fetal development in the rat. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol.**,v.77, p.347-58, 1992.
- ANDREATTA, S.H. *et al.*The ventrolateral medulla. A new site of action of the renin-angiotensin system, **Hypertension**. Feb;11(2 Pt 2):1163-6, 1988. DOI: doi:10.1161/01.hyp.11.2_pt_2.i163
- ANDREW, P.J.; MAYER, B. Enzymatic function of nitric oxide synthase. **Cardiovasc Res.**, v.43(3), p.521-31. 1999.
- ARAKAWA, H.; KAWABE, K.; SAPRU, H.N. Angiotensin-(1–12) in the rostral ventrolateral medullary pressor area of the rat elicits sympathoexcitatory responses, **Exp. Physiol.**, v. 98 (1), p. 94–108, 2013.
- ARNOLD, A. C. *et al.* Angiotensin-(1–12) requires angiotensin converting enzyme and AT1 receptors for cardiovascular actions within the solitary tract nucleus, **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v.299 (3), p. H763–H771, 2010.
- ARTINANO, A. A.; CASTRO, M. M. Experimental rat models to study the metabolic syndrome. **Br. J. Nutr.**, v.102, p1246 -1253, 2009.
- ASHKAN, A. *et al.* Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years **New Engl J Med**, v. 377 (1), p. 13-27, 2017.
- BATISTA FILHO, M. Da fome à segurança alimentar: retrospecto e visão prospectiva. **Cad. de Saúde Pública**, v.19, p. 872-873, 2003.

BATISTA FILHO, M.; RISSINI, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Cad. de Saúde Pública**, v.1, p.181-191, 2003.

BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. **Rev. Bras. Hipertens.**, v.8, p.328-338, 2001.

BALISTRERI, C. R; CARUSO, C.; CANDORE, G. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. **Mediat. Inflamm.**, v.2010, p.1-19, 2010.

BEDARD, K.; KRAUSE, K.H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiol Rev**, v.87,p.245–313, 2007.

BOSSE J.D. *et al.* A low-carbohydrate/high-fat diet reduces blood pressure in spontaneously hypertensive rats without deleterious changes in insulin resistance. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v.304(12), p.H1733-42, 2013.

BOUSTANY, C.M. *et al.* Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** Oct;287(4):R943-9, 2004. DOI: 10.1152/ajpregu.00265.2004.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide general properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem J.**, v.134, p.707–16, 1973.

BRANDES, R. P. Recent Advances in Hypertension: Endothelial Dysfunction and Hypertension. **Hypertens.**, v.64, p.924–28, 2014.

BRETT, D.S., SNYDER, S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proc Natl Acad Sci U S A.**; v.87(2), p.682-85, 1990.

BREWSTER, U.C.; PERAZELLA, M.A.; SETARO, J.F. The Renin-Angiotensin-Aldosterone System: Cardiorenal Effects and Implications for Renal and Cardiovascular Disease States. **Am J Medical Sci.** Vol 326, Issue 1, Pages 15-24 July 2003. <https://doi.org/10.1097/00000441-200307000-00003>

BRIONES, A M.; TOUYZ, R.M. Oxidative stress and hypertension: current concepts. **Curr Hypertens Rep.**, v.12(2),p.135-42, 2010.

BUETTNER, R.; SCHÖLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L.C. High-fat diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity**, v.15, p.798–808, 2007.

CABANDUGAMA, P.K.; GARDNER, M.J.; SOWERS, J.R. The Renin Angiotensin Aldosterone System in Obesity and Hypertension: Roles in the Cardiorenal Metabolic Syndrome. **Med Clin North Am.**, v.101(1), p.129-137, 2017.

CAMPBELL, D.J. Circulating and tissue angiotensin systems. **J. Clin. Invest.**, v.79, p.1-6, 1987.

CAO, J. *et al.* Up regulation of Heme Oxygenase-1 Combined with Increased Adiponectin Lowers Blood Pressure in Diabetic Spontaneously Hypertensive Rats through a Reduction in Endothelial Cell Dysfunction, Apoptosis and Oxidative Stress. **Int. J. Mol. Sci.**, v.9, p.2388-2406, 2008.

CAO, J. *et al.* High fat diet enhances cardiac abnormalities in SHR rats: Protective role of heme oxygenase adiponectin axis. **Diabetol. Metab. Syndr.**, v.21, p.1-13, 2011.

CAO, X.; *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 inhibits endoplasmic reticulum stress-associated pathway to preserve nonalcoholic fatty liver disease. **Diabetes Metab Res Rev.**, v.35(4), e3123, p.1-12, 2019. doi: 10.1002/dmrr.3123.

CASSIS, L.A. *et al.* Local adipose tissue renin-angiotensin system. **Curr Hypertens Rep.**, v.10(2), p.93-8, 2008.

CHEN, Q. *et al.* Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. **J Biol Chem**, v.278, p.36027-36031, 2003.

CHOI, K.M. *et al.* Serum adiponectin, interleukin-10 levels and inflammatory markers in the metabolic syndrome. **Diabetes Res Clin Pract.** , v.75, p.235–240, 2007.

CHUNG, S. *et al.* Tempol or candesartan prevents high-fat diet-induced hypertension and renal damage in spontaneously hypertensive rats. **Nephrol Dial Transplant.**, v.25(2), p.389-99, 2010.

CONTI, M *et al.* High levels of myocardial antioxidant defense in aging nondiabetic normotensive Zucker obese rats. **Am. J. Physiol.** Reg. Integ Comp Physiol, v.286, p.793-800, 2004.

COOPER, S.A *et al.* Renin-angiotensin-aldosterone system and oxidative stress in cardiovascular insulin resistance. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.293, p.H2009– H2023, 2007.

CRANDALL, D. L. *et al.* Angiotensin II receptors in human preadipocytes: role in cell cycle regulation. **Endocrinology**, v.140, p.154–158, 1999.

DANSER, A.H. Local renin-angiotensin systems. **Mol.Cell.Biochem.**, v.157, p.211-216, 1996.

DAS, U.N. Renin-angiotensin-aldosterone system in insulin resistance and metabolic syndrome, **J Transl Int Med.**,4(2):66-72, 2016. doi: 10.1515/jtim-2016-0022.

De FRONZO, R. A. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. **Diabetes**, v.37, p.667-687, 1988.

DESPRES, J.P. Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome? **Ann Med.** V.38, p.52–63, 2006.

DORNAS, W. C.; SILVA, M. Animal models for the study of arterial hypertension. **J. Biosci.**, v.36, p.731–737, 2011.

DOHI, Y.; KOJIMA, M.; SATO, K. Endothelial modulation of contractile responses in arteries from hypertensive rats. **Hypertens.**, v.28, p.732-37, 1996.

DUDA, M.K. *et al.* Low-carbohydrate/high-fat diet attenuates pressure overload-induced ventricular remodeling and dysfunction. **J Card Fail**, v.14, p.327–335, 2008

EL-ATAT, F.; MCFARLANE, S.I.; SOWERS, J.R. Diabetes, hypertension, and cardiovascular derangements: pathophysiology and management. **Curr Hypertens Rep.**; 6(3):215-23, 2004. PMID: 15128475

ENGELI, S.; NEGREL, R.; SHARMA, A.M. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. **Hypertens.**, v.35, p.1270-1277, 2000.

ENGELMANN, G. L.; VITULLO, J. C.; GERRITY, R. G. Morphometric analysis of cardiac hypertrophy during development, maturation and senescence in spontaneously hypertensive rats. **Circ. Res.**, v.60, p.487-494, 1987.

ERTUNC, M.E.; HOTAMISLIGIL, G.S. Lipid signaling and lipotoxicity in metaflammation: indications for metabolic disease pathogenesis and treatment. **J Lipid Res.**, 57(12):2099-2114, 2016. DOI: 10.1194/jlr.R066514.

FAGARD, R. *et al.* Haemodynamic and humoral responses to chronic ketanserin treatment in essential hypertension. **Br Heart J.**; 51(2):149-56, 1984. DOI: 10.1136/hrt.51.2.149

FAZAN, J. R. R.; SILVA, V. J. D.; SALGADO, H. C. Modelos de hipertensão arterial. **Rev. Bras. Hipertens.**, v.8 (1), p.19-29, 2001.

FÉLÉTOU, M.; VERBEUREN, T. J. & VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent contractions in SHR: A tale of prostanoid TP and IP receptors. **Br J Pharmacol.**, v.156(4), p.563–574, 2009.

FERRANNINI, E. *et al.* Insulin resistance in essential hypertension. **N. Engl. J. Med.**, v. 317, p.350-357, 1987.

FERRARIO, C.M.; MULLICK, A.E. Renin angiotensin aldosterone inhibition in the treatment of cardiovascular disease. **Pharmacological Research**, v.125, p. 57–71, 2017.doi: 10.1016/j.phrs.2017.05.020.

FERRARIO, C.M. *et al.* A hypothesis regarding the function of angiotensin peptides in the brain. **Clin Exp Hypertens A.**, 10 Suppl 1:107-21, 1988. doi:10.3109/10641968809075966

FERREIRA, A.J. *et al.* The nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist AVE-0991 attenuates heart failure induced by myocardial infarction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, vol.292(2):H1113-9, 2007. DOI: 10.1152/ajpheart.00828.2006.

FONSECA-ALANIZ, M.H. *et al.* ACE-modulated adiposity is related to higher energy expenditure and independent of lipolysis and glucose incorporation into lipids in adipocytes. **Physiol Genomics.**, v.49(12), p.712-721,2017.

FRANK, B.H. *et al.* Dietary saturated fats and their food sources in relation to the risk of coronary heart disease in women. **Am. J. Clin Nutr.**, v.70, p.1001-8, 1999.

FRIEDMAN, J. *et al.* Oxidative stress in hypertensive,diabetic, and diabetic hypertensive rats. **Am J Hypertens.**, vol.16(12):1049-52, 2003. DOI: 10.1016/j.amjhyper.2003.07.013

FROHLICH, E. D. The adrenergic nervous system and hypertension: State of the art. **Mayo. Clin. Proc.**, v.52, p.361-368, 1977.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v.27: 288(5789), p. 373-376, 1980.

FURCHGOTT, R. F. Role of endothelium in response of vascular smooth muscle. **Circ. Res.**, v.53, p.557-573, 1983.

FARIA-COSTA, G.; LEITE-MOREIRA, A. HENRIQUES-COELHO, T. Efeitos cardiovasculares do receptor tipo 2 da angiotensina. **Rev Port Cardiol.**, v.33(7-8), p.439-49, 2014.

GAILLARD, D.; PASSILLY-DEGRACE, P.; BESNARD, P. Molecular mechanisms of fat preference and overeating. **Ann NY Acad. Sci.**, v.1141, p.162-75, 2008.

GARRISON, R.J. *et al.* Incidence and precursors of hypertension in young adults: the Framingham Offspring Study, **Preventive Medicine**, Volume 16, Issue 2, Pages 235-251, 1987. [https://doi.org/10.1016/0091-7435\(87\)90087-9](https://doi.org/10.1016/0091-7435(87)90087-9)

GEORGIEVA, G. *et al.* Mitochondrial Dysfunction and Redox Imbalance as a Diagnostic Marker of “Free Radical Diseases”, **Anticancer Research**, v.37, p. 5373-5381, 2017.

GIODA, C. *et al.* Impaired cellular contractile function in thiamine-deficient rat cardiomyocytes. **Eur J Heart Fail.**, v.11(12),1126-8, 2009.

GOULOPOULOU, S. & WEBB, R. C. The symphony of vascular contraction: How smooth muscle cells lose harmony to signal increased vascular resistance in hypertension. **Hypertens**, v.63(3), p.e33-339, 2014.

GROSMAN, W. Diastolic dysfunction in congestive heart failure. **N. Engl. J. Med**, v.1:325, p.1557-64, 1991.

GOVERS, R. Cellular regulation of glucose uptake by glucose transporter GLUT4. **Adv Clin Chem.**, v.66, p.173–240, 2014.

HADDOCK, R.E. *et al.* Diet-induced obesity impairs endothelium-derived hyperpolarization via altered potassium channel signaling mechanisms. **PLoS One.**, 21;6(1):e16423, 2011. doi: 10.1371/journal.pone.0016423.

HORSTHUIS, T. *et al.* Distinct regulation of developmental and heart disease-induced atrial natriuretic factor expression by two separate distal sequences. **Circ Res**, v.102(7), p.849–859, 2008.

HOTAMISLIGIL, G.S. *et al.* Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. **J Clin Invest.**, v.95, p.2409 - 15, 1995.

HSUEH, W. A.; LYON, C. J.; QUIÑONES, M. Insulin resistance and the endothelium. **Am. J. Med.**, v.117, p.109-117, 2004.

HUTCHINSON, P. J; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Comparative pharmacology of EDRF and nitric oxide on vascular strips. **Eur. J. Pharmacol.**, v.141(3), p.445-451, 1987.

JONES, B. H., STANDRIDGE, M. K., MOUSTAID, N. Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3–L1 and human adipose cells. **Endocrinol** , v.138, p.1512–1519, 1997.

KANE, M. O. *et al.* Endothelium-derived contracting factors mediate the Ang II induced endothelial dysfunction in the rat aorta: preventive effect of red wine polyphenols. **Pflugers Arch**, v.459, p. 671–679,2010.

KARPE, F.; DICKMANN, J. R. & FRAYN, K. N. Fatty acids, obesity, and insulin resistance: Time for a reevaluation. **Diabetes**, v.60(10), p.2441–2449, 2011.

KERR, S. *et al.* Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium. **Hypertens.**, v.33(6), p.1353-38, 1999.

KHEDHER, M. R. B. *et al.* Preventive effects of *Salvia officinalis* leaf extract on insulin resistance and inflammation in a model of high fat diet-induced obesity in mice that responds to rosiglitazone. **Peer J.**, v.6, p.e4166, 2018, doi: 10.7717/peerj.4166.

KIM M.J. *et al.* Hepatoprotective Effects of MHY3200 on High-Fat, Diet-Induced, Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Rats. **Molecules.**, v.16, p.23(8), 2018 pii: E2057. doi: 10.3390/molecules23082057.

KLOP, B.; ELTE, J. W.; CABEZAS, M. C. Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. **Nutrients.**, vol. 12;5(4):1218-40, 2013. doi: 10.3390/nu5041218.

KOBAYASI R. *et al.* Oxidative stress and inflammatory mediators contribute to endothelial dysfunction in high-fat diet-induced obesity in mice. **J. Hypertens.**, v.28 (10), p. 2111-2119, 2010.

KUMASHIRO, N. *et al.* Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.108(39), p.16381–16385, 2011.

KUNWAR, A.; PRIYADARSINI, K. I. Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. **J Med Allied Sci.**, v.1(2), p.53–60, 2011.

KURUKULASURIYA, L. R. *et al.* Hypertension in obesity, **Med Clin North Am.**, vol.95(5):903-17, 2011. doi: 10.1016/j.mcna.2011.06.004.

LAU, T.; CARLSON, P. O.; LEUNG, P. S. Evidence for a local angiotensin-generating system and dose-dependent inhibition of glucose-stimulated insulin release by angiotensin II in isolated pancreatic islets. **Diabetologia.**, vol. 47(2):240-8, 2004. DOI: 10.1007/s00125-003-1295-1

LEGUISAMO, N.M. *et al.* GLUT4 content decreases along with insulin resistance and high levels of inflammatory markers in rats with metabolic syndrome. **Cardiovasc. Diabetol.**, v.11, p.100-110; 2012.

LELYS, D. F. *et al.* Angiotensin-(1-7), Adipokines and Inflammation, **Metabolism**, v.95, p. 36-45, 2019.

LEVY, D. *et al.* The progression from hypertension to congestive heart failure. **JAMA**, v.275(20), p.1557-62, 1996.

LERMAN, L.O. *et al.* Animal Models of Hypertension A Scientific Statement From the American Heart Association. **Hypertension**; v.73, p. e1-e34, 2019. doi: 10.1161/HYP.0000000000000090

LI, X. *et al.* Angiotensin converting enzyme-2 is protective but downregulated in human and experimental lung fibrosis. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.**, v.295(1),L178-85, 2008.

LIU, W. *et al.* Antioxidant Mechanisms in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Curr Drug Targets**; v.16(12), p.1301-14, 2015.

LUDMER, P. L. *et al.* Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. **N. Engl. J. Med.**, v.315 (17), p.1046-1051, 1986.

LUTHER, J.M., BROWN, N.J. The renin-angiotensin-aldosterone system and glucose homeostasis. **Trends Pharmacol Sci.**, 32(12):734-39, 2011.

MA, M. C. J. *et al.* Contribution of independent and pleiotropic genetic effects in the metabolic syndrome in a hypertensive rat. **PLoS One.**, v.8, p.12(8), 2017.

MACHADO, U.F.; SHIMIZU, I.; SAITO, M. Reduced content and preserved translocation of glucose transporter (GLUT 4) in white adipose tissue of obese mice. **Physiol Behav.**, v.55(4), p.621-5, 1994.

MORI, R. C. *et al.* Glimepiride as insulin sensitizer: increased liver and muscle responses to insulin. **Diabetes Obes Metab.**, v.10(7), p. 596-600, 2008.

MATIAS, A. M. *et al.* Differential Effects of High Sugar, High Lard or a Combination of Both on Nutritional, Hormonal and Cardiovascular Metabolic Profiles of Rodents. **Nutrients.**, v.11, p.10(8), 2018. doi: 10.3390/nu10081071.

MAHMOOD, I. H.; ABED, M. N.; MERKHAN, M.M. Effects of blocking of angiotensin system on the prevalence of metabolic syndrome in type 2 diabetic patients. **Pak J Med Sci**, V. 29 N. 1, 2013.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J. Biol Chem**, v.268, p.12231-34, 1993.

MARTÍNEZ-REVELLES, S. *et al.* Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. **Antioxid Redox Signal.**, v.18(1), p.51-65,2013. doi: 10.1089/ars.2011.4335.

MENDEZ-SANCHEZ, N. *et al.* Current concepts in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. **Liver Int.**, v.27, p.423–433, 2007.

MOHAMED-ALI, V.; PINKNEY, J. H.; COPPACK, S. W. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. **Int J Obes.**, v.22, p.1145-58, 1998

MONCADA, S. *et al.* An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**, v.21, n.263(5579), p.663-665, 1976.

MONCADA, S.; RADOMSKY, M. W.; PALMER, R.M. Endothelium-derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. **Biochem.Pharmacol.**, v.37, p.2495-501, 1988.

MORIS, D. *et al.* The role of reactive oxygen species in myocardial redox signaling and regulation. **Ann Transl Med.**, v.5(16), p.324-328, 2017.

MULVANY, M.J.; NYBORG, N. An increased calcium sensitivity of mesenteric resistance vessels in young and adult spontaneously hypertensive rats. **Br. J Pharmacol.**, v.71(2), p.585-596, 1980.

NATOLI, R. *et al.* Obesity-induced metabolic disturbance drives oxidative stress and complement activation in the retinal environment. **Mol. Vision**, v. 24, p. 201–217, 2018.

NICOLAI, A. *et al.* Heme Oxygenase-1 Induction Remodels Adipose Tissue and Improves Insulin Sensitivity in Obesity-Induced Diabetic Rats. **Hypertension**, 53: 508-505, 2009.

NUNES-SOUZA, V. *et al.* Aging Increases Susceptibility to High Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome in C57BL/6 Mice: Improvement in Glycemic and Lipid Profile after Antioxidant Therapy. **Oxid Med Cell Longev.** 2016;2016: 1987960. doi: 10.1155/2016/1987960. Epub 2016 Feb 18.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jpn. Circ. J.**, 27: 282-293, 1963.

OSTERREICHER, C. H. *et al.* Angiotensin-converting-enzyme 2 inhibits liver fibrosis in mice. **Hepatology**, 50(3):929-38, 2009.

PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 327: 524-526, 1987.

PALMER, R. M. J.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, 333:664-66, 1988.

PATEL, S. K. *et al.* Left ventricular hypertrophy in experimental chronic kidney disease is associated with reduced expression of cardiac Kruppel-like factor 15. **BMC Nephrol.**, v.19: p.1-8, 2018.

PFEFFER, M. A.; BRAUNWALD, E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. **Circulation**, 81(4):1161- 72, 1990.

POLAKOF, S. *et al.* Resistant starch intake partly restores metabolic and inflammatory alterations in the liver of high-fat-diet-fed rats. **J. Nutr Biochem.**, 24 (11): 1920-30, 2013.

POTENZA, M. A. *et al.* Treatment of spontaneously hypertensive rats with rosiglitazone ameliorates cardiovascular pathophysiology via antioxidant

mechanisms in the vasculature. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, 297: 685–694, 2009.

POTTER, L.R. *et al.* Natriuretic Peptides: Their Structures, Receptors, Physiologic Functions and Therapeutic Applications, **Handb Exp Pharmacol.**, v.(191), p. 341–366, 2009. doi:10.1007/978-3-540-68964-5_15

PRAVENEK, M. *et al.* Identification of renal Cd36 as a determinant of blood pressure and risk for hypertension. **Nat. Genet.**, v. 40, p. 952-954, 2008.

PREMARATNA, S. D. *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibition reverses diet-induced obesity, insulin resistance and inflammation in C57BL/6J mice. **Int. J. Obesity**, v. 36, n. 2, p. 233–243, 2012.

RAMALINGAN, L. *et al.* The renin angiotensin system, oxidative stress and mitochondrial function in obesity and insulin resistance, **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1863, p.1106–1114, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.07.019>

RAPOPORT, R. M.; MURAD, F. Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP. **J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res.**, 9(4-5):281-96, 1993.

RAPOPORT, R. M.; DRAZNIN, M. B.; MURAD, F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. **Nature**, 306(5939):174-76, 1993.

RAY, R.; SHAH, A. M. NADPH oxidase and endothelial cell function. **Clinical Science**, v.109, p. 217–226, 2005. doi:10.1042/CS20050067

REAVEN, G. M. Metabolic syndrome: Pathophysiology and implications for management of cardiovascular disease. **Circulation**, 106: 286-88, 1988.

REEVES, P. G.; ROSSOW, K. L.; LINDLAUF, J. Development and testing of the AIN-93 purified diets for rodents: results on growth, kidney calcification and bone mineralization in rats and mice. **J Nutr.** 123(11):1923-31, 1993a.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., JR., AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr** . 123(11):1939–1951, 1993b.

RENNA, N.F. *et al.* Role of Renin-Angiotensin System and Oxidative Stress on vascular Inflammation in Insulin Resistance Model; **Intern J. Hypertens**, 9 pages, Vol 2013, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/420979>.

RIBEIRO-FILHO, F. F. *et al.* Gordura visceral e síndrome metabólica: mais que uma simples associação. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, 50: 230-38, 2006.

RIDKER, P. M.; GABOURY, C. L. Stimulation of plasminogen activator inhibitor in vivo by infusion of angiotensin II. Evidence of a potential interaction between the reninangiotensin system and fibrinolytic function. **Circulation.**,87(6):1969-73. 1993.

RIZZONI, D. *et al.* Vascular structural and functional alterations before and after the development of hypertension in SHR. **Am J Hypertens.**, 7(2):193-200, 1994.

ROMERO, M. *et al.* Sex differences in the beneficial cardiac effects of chronic treatment with atrial natriuretic peptide in spontaneously hypertensive rats. **PlosOne**, 8 (8): 71992, 1-8, 2013.

RODRÍGUEZ-LARA, S. Q.; GARCÍA-BENAVIDES, L.; MIRANDA-DÍAZ, A. G. The Renin-Angiotensin-Aldosterone System as a Therapeutic Target in Late Injury Caused by Ischemia-Reperfusion. **Intern. J. Endocrinol.**, vol. 2018, Article ID 3614303, 18 pag.

ROTTER, V.; NAGAEV, I.; SMITH, U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. **J Biol Chem.**,278:45777- 84, 2003.

RUILOPE, L. M.; SCHMIEDER, R. E. Left ventricular hypertrophy and clinical outcomes in hypertensive patients. **Am J Hypertens.**, , 21(5):500-8, 2008.

RUPÉREZ, A. I.; GIL, A.; AGUILERA, C. M. Genetics of oxidative stress in obesity. **Int. J. Mol. Sci.**, 15 (2): 3118-44, 2014.

SANTOS, R. A. S.; FAGUNDES-MOURA, C. R.; SILVA, A. C. S. Efeitos cardiovasculares e renais do sistema renina-angiotensina. **Rev Bras Hipertens** 3: 227-36, 2000.

SANTOS, E. L. *et al.* Effect of angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on body weight and composition in young rats. **Internat. Immunopharmacol.**, 8 : 247-253,2008.

SAINT-MARC, P. *et al.* Angiotensin II as a trophic factor of white adipose tissue: stimulation of adipose cell formation. **Endocrinol.** 142 : 487–492, 2001.

SCHILLACI, G. *et al.* Prognostic value of the metabolic syndrome in essential hypertension. **Am. Coll. Cardiol.**,43:1817-22, 2004.

SCHINZARI, F. *et al.* Co- existence of functional angiotensin II type 2 receptors mediating both vasoconstriction and vasodilation in humans. **J Hypertension.**, v. 29, p.1743 – 48, 2011.

SHIOU, Y. L. *et al.* High fat diet aggravates atrial and ventricular remodeling of hypertensive heart disease in aging rats. **J Formos Med Assoc.** 117(7):621-631, 2018.. doi: 10.1016/j.jfma.2017.08.008.

SILVA, O. A. Estudo dos efeitos de novas tiazolidinadionas sobre a disfunção metabólica causada por dieta hiperlipídica em ratos, dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 2010.

SIRIWARDHANA, N. *et al.* Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. **J Nutr Biochem.**, 24:613 - 23, 2013.

Sociedade Brasileira de Cardiologia, VII Diretriz brasileira de hipertensão arterial, **Arq Bra de Cardiol.**, volume 107, n. 3, suplemento 3, 2016.

SOWERS, J.R. Hypertension, Angiotensin II, and Oxidative Stress. **N Engl J Med**; 346:1999-2001, 2002.

STEPHENS, J. M.; LEE, J.; PILCH, P.F. Tumor necrosis factor- α -induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. **J Biol Chem.**, 272: 971–976, 1997

TOGO, M. *et al.* Effects of a high-fat diet on superoxide anion generation and membrane fluidity in liver mitochondria in rats, **J.Int. Soc.Sports Nutr.**, 15:13,2018, <https://doi.org/10.1186/s12970-018-0217-z>

TOUYZ, R. M. *et al.* Vascular smooth muscle contraction in hypertension. **Cardiovasc. Res.**, 144: 529–39, 2018.

THOMAS, E. L. *et al.* Magnetic resonance imaging of total body fat. **J Appl Physiol.**,85:1778 - 85, 1998.

THOMPSON, D. *et al.* Physical activity and exercise in the regulation of human adipose tissue physiology. **Physiol Rev.** 92:157–191, 2012.

VANHOUTTE, P. M. Epithelium-derived relaxing factor(s) and bronchial reactivity. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 138 (6 Pt 2): 24-30, 1988.

VELLOSO, L. A. The hypothalamic control of feeding and thermogenesis implications on the development of obesity. **Arq Bras Endocrinol Metab.** vol.50 ,no.2 São Paulo. 2006

VIARO, F. *et al.*, Expressão da oxido nítrico sintetases na fisiologia de doenças cardiovasculares, **Arq. Bras. Cardiol.**, 74(4), 365-379, 2000.

WANG, Y.; SETO, S. W.; GOLLEDGE, J. Angiotensin II, sympathetic nerve activity and chronic heart failure, **Heart Fail Rev.**, v.19(2), p.187-98, 2014. doi: 10.1007/s10741-012-9368-1

WEN, H.; GWATHMEY, J. K.; XIE, L. Oxidative stress-mediated effects of angiotensin II in the cardiovascular system; **World J Hypertens**; 23; 2(4): 34–44, 2012.

XUE, B. *et al.* Central Renin–Angiotensin System Activation and Inflammation Induced by High-Fat Diet Sensitize Angiotensin II–Elicited Hypertension, **Hypertension**, 67:00-00, 2016.

YANAGISAWA, M. *et al.* novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels; **J Hypertens Suppl.**,6(4):S188-91, 1988

YAMAWAKI, H. Vascular Effects of Novel Adipocytokines: Focus on Vascular Contractility and Inflammatory Responses Hideyuki. **Biol. Pharm. Bull.** 34(3): 307-310, 2011.

ZYGMUNT, P. M.; RYMAN, T. & HÖGESTÄTT, E. D. Regional differences in endothelium-dependent relaxation in the rat: contribution of nitric oxide and nitric oxide-independent mechanisms. **Acta Physiol Scand**, 155(3), 257–266, 1995.