

NAYARA DE ARAUJO MUZILI

**Influência do bloqueio de receptor de angiotensina II na modulação
do fenótipo muscular esquelético em ratos submetidos à dieta
hiperlipídica**

Campo Grande

2016



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E
DESENVOLVIMENTO NA REGIÃO CENTRO-OESTE



NAYARA DE ARAUJO MUZILI

**Influência do bloqueio de receptor de angiotensina II na modulação
do fenótipo muscular esquelético em ratos submetidos à dieta
hiperlipídica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Faculdade de Medicina Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Adj. *Paula Felipe Martinez*

Campo Grande

2016

Dedicatória

Ao meu Deus, meu Mestre, por me guiar e abençoar meus caminhos. Fonte de todo meu conhecimento e paz em meu ser. Agradeço todas conquistas, todas as oportunidades e, principalmente, por estar sempre comigo.

Aos meus pais amados, Claudio e Marilza, pelo amor e cuidado incondicional. Agradeço por serem meus exemplos, minha referência de dignidade, ética, honestidade e perseverança na busca dos nossos sonhos. Agradeço por vocês sempre terem acreditado em mim, até mesmo quando eu não acreditava. Vocês são minha base e minha maior motivação de vida.

Ao meu irmão Wanderlei, que é alguém que me incentiva a crescer e ser uma pessoa melhor. Obrigada por seu apoio e por ser presente mais lindo que nossos pais deram para mim. Agradeço por ser minha companhia, meu maninho e meu amigo.

Ao meu namorado, Cássio, por ser meu amigo, meu companheiro. Obrigada por ser essa pessoa maravilhosa, paciente e dedicada. Agradeço por partilhar sua vida comigo, por me abraçar nos momentos difíceis e sorrir comigo nos momentos alegres. Minha vida se tornou mais linda com sua chegada.

A toda minha família, meus avós, tios e tias, primos e primas, irmãs, sobrinhas, por fazerem parte da minha vida e terem contribuído de alguma forma em minha história!

Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul - FUNDECT e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo suporte financeiro, viabilizando o desenvolvimento desta pesquisa científica.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Paula Felipe Martinez, pelo acolhimento profissional, oportunidade valiosa de aprendizagem. Obrigada por ter acreditado em mim desde o começo, por ter se dedicado tanto, pelo apoio e confiança no meu trabalho. A senhora foi fundamental em todas as etapas desta construção. Muito obrigada por me ensinar em todos os momentos! Levarei tudo que aprendi para toda minha vida. Minha admiração e gratidão...

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Silvio Assis de Oliveira Júnior, pelo apoio, pela dedicação, por todas contribuições científicas, disponibilidade e empenho.

Aos professores, Antônio Carlos Cicogna, Marina Politi Okoshi e Katashi Okoshi pelo acolhimento em Botucatu, por contribuírem tão especialmente na realização deste trabalho e terem ajudado tanto no meu crescimento profissional e pessoal.

Aos amigos que me acolheram em Botucatu e fizeram desta jornada tão proveitosa, edificante e alegre. Obrigada ao grupo do doutor Cicogna: Paulinha Grippa, Dijon, Sérgio, Gustavo, Vitor, Dani Villeigas, Cecília, Scarlet, Loreta, Damiana, Elenize. Obrigada ao grupo da Dra. Marina e Dr. Katashi: Mari, Luana, Marcelo, Ricardo, Morango, Bonomo e Camilinha.

Aos amigos e colegas do grupo do prof. Silvio e profa. Paula: Priscilla Gois, Ana Priscila, Daya das Graças, Giulliano, Mari Rabello, Dayanne, Fernando, Camila e Gabriel. Obrigada por me ajudarem e contribuírem para a realização deste trabalho.

Aos amigos da célula, Joziane, Daiana, Urso, Samuel, Lu, Célio, Aline, Cristhian, Cleber, Vinicius, por estarem comigo e me ajudarem sempre. Vocês fazem a diferença. Obrigada por todo apoio, cuidado e carinho.

A todos funcionários da Unidade de Pesquisa Experimental - UNIPLEX, em especial Paulinho, José, Diego, Sueli Clara, Lucas, Geogertte, De Lalla, Florian (in memorian) e Eduardo.

Aos funcionários do Programa de Pós- Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, que sempre estiveram disponíveis e contribuíram para nosso desenvolvimento, em especial a Vera e Áurea.

Ao corpo docente do Programa de Pós – Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Faculdade de Medicina da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Aos meus queridos professores da graduação do curso de fisioterapia da UFMS, responsáveis pela minha formação: Paula, Silvio, Mara, Adriane, Laís, Aline, Rodrigo, Albert, Gustavo, Charles, Leila, Evandro, Suzi, Fernando e Ana Beatriz.

Ao prof. Arthur Medeiros e à doutoranda Amariles Diniz pelas contribuições valiosas na banca de qualificação.

Ao Lucas do Laboratório de Imagens pela disponibilidade, pela simpatia e ânimo dispensado nos dias de análise.

Aos funcionários do Laboratório de Biofisiofarmacologia – UFMS.

"Eu acredito na fé, na vontade essencial de transformação, no gesto aliado à vontade, e, especialmente, no amor que recebemos, nas temporadas difíceis, de quem não desiste da gente".

(Ana Jácomo)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis nutricionais.....	27
Tabela 2. Variáveis anatômicas e murinométricas.....	28
Tabela 3. Perfil bioquímico sérico.....	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Delineamento Experimental.....	23
Figura 2. Avaliação morfométrica do tecido muscular esquelético.....	30
Figura 3. Cortes histológicos transversais do músculo esquelético gastrocnêmio corados com hematoxilina-eosina.....	31
Figura 4. Cortes histológicos transversais do músculo esquelético sóleo corados com hematoxilina-eosina.....	31
Figura 5. Fração Intersticial de Colágeno – FIC (%).....	33
Figura 6. Cortes histológicos transversais do músculo esquelético gastrocnêmio corados com Picrosirius-Red.....	34
Figura 7. Cortes histológicos transversais do músculo esquelético Sóleo corados com Picrosirius-Red.....	34
Figura 8. Expressão proteica da JNK no músculo gastrocnêmio e sóleo.....	36
Figura 9. Foto da membrana da JNK no músculo gastrocnêmio e sóleo.....	37
Figura 10. Expressão proteica de AT1 no músculo gastrocnêmio e sóleo.....	38
Figura 11. Foto da membrana de AT1 no músculo gastrocnêmio e sóleo.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT – Proteína quinase B

ANG – Angiotensinogênio

AngII – Angiotensina II

AT1 – Receptor de angiotensina tipo 1

AT2 – Receptor de angiotensina tipo 2

AT4 – Receptor de angiotensina tipo 4

BRAs – Bloqueadores de receptores de angiotensina

C – Grupo controle

CCt – Consumo calórico total

CL – Grupo controle losartan

CR – Comprimento do rato

CTGF – Fator de crescimento do tecido conjuntivo

DG – Depósitos de gordura

DH – Grupo dieta hiperlipídica

DHL – Grupo dieta hiperlipídica losartan

EA – Eficiência alimentar

ECA – Enzima conversora de angiotensina

EDT – Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)

EGTA – Ácido etilenoglicol tetra-acético (EGTA)

ERK – *Extracellular signal-regulated kinase*

FIC – Fração Intersticial de Colágeno

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

HDL – Lipoproteína de Alta Intensidade

JNK – *C-Jun N-terminal kinase*

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade

MAPK – Proteínas quinases ativadas por mitógeno

MC – Massa corporal

MCf – Massa corporal final

MCi – Massa corporal inicial

MKP-1 – MAPK fosfatase 1

PI3K – fosfatidilinositol-3-kinase

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SRAA – Sistema renina-angiotensina-aldosterona

TGF- β – Fator de crescimento transformador-beta

UFMS – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

UNESP – Universidade Estadual Paulista

UNIPEX – Unidade de Pesquisa Experimental

VLDL – Lipoproteínas de muito baixa densidade

SUMÁRIO

RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
INTRODUÇÃO.....	14
REVISÃO DE LITERATURA.....	16
OBJETIVOS.....	21
MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
Delineamento experimental.....	22
Composição das dietas.....	23
Eutanásia dos animais e coleta de tecidos.....	23
Perfil bioquímico sérico.....	24
Análise histológica da musculatura esquelética.....	25
<i>Western blot</i>	25
Análise estatística.....	26
RESULTADOS.....	27
DISCUSSÃO.....	40
CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS.....	45
APÊNDICE.....	58

RESUMO

INTRODUÇÃO: Alterações musculares foram verificadas em estudos clínicos e experimentais sobre obesidade. Há evidência que a angiotensina II (AngII) está aumentada sistemicamente na obesidade, porém o seu papel na modulação de modificações musculares na obesidade ainda não foi elucidado. **OBJETIVO:** Avaliar a influência do bloqueio do receptor de angiotensina II sobre vias sinalizadoras envolvidas na modulação do fenótipo muscular em ratos submetidos à dieta hiperlipídica. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Ratos Wistar machos (n=48, 30 dias de idade) foram distribuídos em dois grupos: C e DH. O grupo controle (C) foi tratado com dieta normocalórica e os animais do grupo DH com dieta hiperlipídica. O período experimental teve duração de 20 semanas. Na 16ª semana, cada grupo foi subdividido: C e C+Los; DH e DH+Los. Os grupos C e DH continuaram recebendo as respectivas dietas durante mais quatro semanas. Os grupos C+Los e DH+Los, além do suporte nutricional, foram tratados com losartan (30 mg/kg/dia). Foram realizadas as seguintes análises dos músculos sóleo e gastrocnêmio (porção branca): mensuração da área seccional transversa das fibras musculares, quantificação da fração intersticial de colágeno, avaliação da expressão proteica do receptor AT1 e de JNK. **RESULTADOS:** Os animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram aumento da área seccional transversa das fibras do músculo gastrocnêmio, associado à diminuição da ativação da JNK e aumento na expressão dos receptores AT1. O losartan reduziu a expressão de AT1 nos músculos sóleo e gastrocnêmio e reduziu a fração intersticial de colágeno no músculo sóleo no grupo alimentado com dieta hiperlipídica. **CONCLUSÕES:** O consumo de dieta hiperlipídica está associado com alterações morfológicas e moleculares na musculatura esquelética, porém de forma diferenciada em músculos com predominância de fibras lentas ou de fibras rápidas. Ademais, essas alterações são parcialmente moduladas pela angiotensina II.

Palavras-chave: obesidade, músculo esquelético, angiotensina II

ABSTRACT

INTRODUCTION: Skeletal muscle changes have been described in clinical and experimental studies about obesity. Angiotensin II (AngII) concentration is systematically elevated in obesity condition. However, the role of AngII in modulating muscle alterations during obesity is not clear. **OBJECTIVE:** This study aimed to evaluate the influence of the angiotensin II receptor blockade on signaling pathways and muscle phenotype in rats with high fat diet-induced obesity. **MATERIALS AND METHOD:** Male *Wistar* rats (n = 48, 30 days of age) were divided into two groups: C and HD. The control group (C) was treated with normocaloric diet, and the animals from HD group were fed with high-fat diet. The experimental period lasted for 20 weeks. After 16 weeks, each group was divided into two: C and C + Los; HD and HD + Los. The C and HD groups continued to receive their respective diets for four weeks. In addition of nutritional support, the C + Los and DH + Los groups were treated with losartan (30 mg/kg/day). Cross sectional fiber area, collagen interstitial fraction, and AT1 receptor and JNK protein expression were analyzed in soleus and gastrocnemius (white portion) muscles. **RESULTS:** HD and HD + Los groups showed higher fiber cross sectional area in gastrocnemius muscle in association to reduced JNK activation and increased AT1 receptor protein expression. Treatment with losartan reduced AT1 expression in both soleus and gastrocnemius muscle, and diminished collagen interstitial fraction in soleus muscle in DH + Los group. **CONCLUSIONS:** High-fat diet promotes differential morphological and molecular alterations in fast- and slow-twitch muscles. Moreover, these changes are partially modulated by angiotensin II.

Keywords: obesity, skeletal muscle, angiotensin II

INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos anos, a obesidade tem se tornado um importante problema de saúde pública, sendo responsável por aproximadamente 2,8 milhões de mortes por ano no mundo ¹. Em 2014, segundo a Organização Mundial da Saúde ², havia 600 milhões de obesos no mundo, índice que teve um crescimento de 100% desde a década de 80. No Brasil, segundo dados da Vigilância de Fatores de Risco para Doenças Crônicas por Inquérito por Telefone do Ministério da Saúde ³, estimou-se que 17,9% da população apresentavam-se obesos no ano de 2013.

A obesidade é uma doença crônica de origem multifatorial ⁴ caracterizada pela quantidade excessiva de gordura no organismo ⁵. Além disso, é considerada fator de risco evitável para o crescente índice de morbimortalidade no mundo e está intimamente relacionada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e acidente vascular encefálico, diabetes, disfunções musculoesqueléticas e câncer ^{5,6}.

No que se refere ao sistema musculoesquelético, estudos clínicos mostram que indivíduos obesos podem apresentar alterações funcionais, morfológicas e bioquímicas nas fibras musculares esqueléticas⁷⁻¹⁴. Dentre estas alterações, podemos destacar redução de força e resistência muscular e da capacidade funcional⁷; maior depósito de gotículas de lipídio nas fibras musculares¹³ e prejuízo da capacidade oxidativa¹⁴.

Em estudos experimentais sobre a obesidade, tanto em modelos genéticos ^{15,16} quanto em modelos de obesidade induzida por dieta ^{17,18}, diversas alterações no tecido muscular esquelético também têm sido identificadas, como redução na proporção das fibras do tipo I e da expressão da isoforma tipo I da cadeia pesada de miosina¹⁵, apoptose e atrofia de fibras ¹⁷ e redução do metabolismo oxidativo ¹⁸.

Diversos fatores podem modular o fenótipo muscular, dentre os quais a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona ¹⁹. A angiotensina II (AngII) é o principal efetor do sistema renina-angiotensina-aldosterona e desempenha múltiplas funções fisiológicas ²⁰. A AngII desempenha suas funções por intermédio de dois tipos de receptores, tipo 1 (AT1) e tipo 2 (AT2), embora a maioria dessas funções seja mediada pelo AT1 ²¹. No que se refere ao tecido muscular esquelético, estudos afirmam que a AngII pode produzir efeitos deletérios, como aumento na degradação de proteínas, apoptose ²², atrofia ²³ e fibrose ²⁴.

Entre as vias moleculares pelas quais a AngII pode promover alterações na musculatura esquelética, destaca-se a via das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) ^{25,26}. As MAPK incluem quatro subfamílias, das quais três já estão bem caracterizadas: ERKs, JNKs e p38-MAPK. As ERKs estão envolvidas, principalmente, em processos anabólicos, como divisão celular, crescimento e diferenciação, enquanto as JNKs e p38-MAPK estão mais associadas com respostas celulares a diversos tipos de estresse ^{27,28}.

Há substancial evidência que os componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona, incluindo a angiotensina II, estão aumentados sistemicamente na obesidade ²⁹. Fármacos bloqueadores dos receptores de angiotensina têm sido amplamente utilizados no estudo do sistema-renina-angiotensina-aldosterona em diversos tecidos, inclusive no músculo esquelético ^{30,31}. Camundongos alimentados com dieta rica em gordura e submetidos ao tratamento com bloqueador de receptor de AngII apresentaram melhora da capacidade para realização de exercícios físicos associada à melhora da função mitocondrial e diminuição do estresse oxidativo no músculo esquelético ³¹.

Entretanto, o papel da angiotensina II e as vias de sinalização pelas quais ela pode modular o fenótipo muscular na obesidade ainda não foram totalmente elucidados. Diante do exposto, levantamos a hipótese que, em ratos obesos, a angiotensina II modula a expressão das MAPK e promove alterações fenotípicas na musculatura esquelética.

REVISÃO DE LITERATURA

Dados epidemiológicos sobre obesidade

A obesidade é uma doença crônica caracterizada pela quantidade excessiva de gordura no organismo ⁵. Tem origem multifatorial, causada pela interação de fatores genéticos, metabólicos, sociais, comportamentais e culturais ⁴. Está associada ao crescente índice de morbimortalidade no mundo ⁶, sendo considerada uma epidemia global que atinge países desenvolvidos e subdesenvolvidos e abrange todas as faixas etárias ². Segundo a Organização Mundial da Saúde ², em 2014, a estimativa foi de 600 milhões de obesos no mundo, dobro do índice desde a década de 80.

No Brasil, em 2013, segundo dados da Vigilância de Fatores de Risco para Doenças Crônicas por Inquérito por Telefone do Ministério da Saúde ³, estimou-se que 17,9% da população apresentavam-se obesos, demonstrando um aumento significativo desde 2006, ano em que a obesidade acometia 11,9% dos brasileiros. Esse crescimento é preocupante, pois a obesidade está intimamente relacionada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diabetes, disfunções musculoesqueléticas e câncer, as quais são as principais causas de gastos em saúde, incapacidade e morte no mundo ⁵. Ademais, no Brasil, essas doenças crônicas são responsáveis por 72% dos óbitos ³.

Alterações Musculares na Obesidade

O tecido muscular esquelético compreende de 40 a 50% da massa corporal de um indivíduo e constitui elemento essencial para o movimento e desempenho de atividades funcionais ³².

Estudos clínicos mostram que indivíduos obesos podem apresentar redução de força e resistência muscular e diminuição da capacidade para realização de esforços submáximos e de alta intensidade ³³, além de alterações na mecânica respiratória ³⁴, com possível impacto negativo sobre a aptidão para realização de atividades de vida diária ^{9,10,11} e exercício físico ¹². Além disso, exigências biomecânicas anormais impostas pelo excesso de peso aos movimentos corporais associadas à força muscular reduzida podem gerar fadiga precoce e aumentar o risco para disfunções do sistema musculoesquelético ³⁵.

Além das alterações funcionais, também foram descritas alterações morfológicas e bioquímicas em pessoas obesas. Por meio de biópsia e análise histoquímica do músculo vasto lateral, Goodpaster e col.¹³ observaram maior depósito de gotículas de lipídio nas fibras musculares esqueléticas de sujeitos obesos quando comparados a pessoas magras. Ademais, outros autores observaram importantes mudanças no metabolismo intracelular das fibras musculares de sujeitos obesos, com redução da eficiência de mitocôndrias subsarcolemais e prejuízo da capacidade oxidativa¹⁴.

Alterações musculares também têm sido verificadas em estudos experimentais sobre obesidade, tanto em modelos genéticos^{15,16} quanto em modelos de obesidade induzida por dieta^{17,18,36}. Conturier *et al.*¹⁵ observaram redução na proporção das fibras do tipo I e da expressão da isoforma tipo I da cadeia pesada de miosina no músculo reto femoral em ratos Zucker obesos, animais que apresentam predisposição genética à obesidade, decorrente de mutação no gene do receptor de leptina e consequente hiperfagia³⁷. Em outro modelo experimental, ratos da linhagem *Otsuka*, geneticamente predispostos à diabetes do tipo II e obesidade, também apresentaram menor porcentagem de fibras do tipo I e IIA em comparação com animais não obesos e não diabéticos¹⁶.

Diversos modelos experimentais de obesidade induzida por dieta (obesidade exógena) também têm sido amplamente estudados, uma vez que se assemelham à condição de obesidade em humanos. Sishi *et al.*¹⁷ verificaram que ratos submetidos a dieta hipercalórica do tipo ocidental (com sobrecarga de lipídeos e carboidratos) por 16 semanas apresentaram ativação inflamatória associada à apoptose e atrofia de fibras musculares. Em estudo conduzido por Wessels *et al.*³⁶, a administração de dieta hiperlipídica (com sobrecarga de ácidos graxos saturados) por quinze semanas promoveu efeito deletério na eficiência energética mitocondrial *in vivo*, provocando redução da capacidade de oxidação de ácidos graxos. Em outro trabalho, foram utilizadas dietas enriquecidas com óleo de peixe, óleo de soja ou banha¹⁸. Ratos que ingeriram dieta rica em banha por quatro semanas apresentaram menor ativação do metabolismo oxidativo muscular quando comparados aos animais que receberam dieta rica em óleo de peixe pelo mesmo período¹⁸. Lionetti *et al.*³⁸ também utilizaram óleo de peixe como fonte de gorduras insaturadas e a banha como fonte de gordura saturada. Estes autores verificaram que apenas a dieta rica

em gordura saturada provocou aumento de marcadores inflamatórios e aumento do depósito de lipídios no músculo gastrocnêmio de ratos.

Obesidade, Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona e Angiotensina II

O acúmulo anormal de gordura é ocasionado por desequilíbrio entre ingestão calórica e gasto energético ², proporcionando aumento do tecido adiposo no organismo. Este acúmulo ocorre por meio do aumento da armazenagem de lipídios nos adipócitos ou do número de adipócitos, os quais são originados a partir de pré-adipócitos existentes, prontos para diferenciação quando um sinal apropriado é dado^{39,40}. Além dos adipócitos e pré-adipócitos, também estão presentes no tecido adiposo fibroblastos, células endoteliais, leucócitos, monócitos e macrófagos residentes ^{41,42}.

Outrora, muito se pensava que o tecido adiposo apenas realizava o armazenamento energético no organismo. Entretanto, atualmente, estudos afirmam que o tecido adiposo não é apenas um tecido inerte com a finalidade de estoque de energia, mas também é descrito como tecido complexo, essencial, metabólico e com funções endócrinas ^{29,43,44}, produzindo diversas substâncias, entre elas a angiotensina II ⁴⁵.

A angiotensina II (AngII) é o principal efetor do sistema renina-angiotensina-aldosterona e desempenha múltiplas funções fisiológicas, incluindo regulação da pressão arterial, por meio de vários efeitos no sistema nervoso central, glândula adrenal, vasos e rins ²⁰. Estudos afirmam que o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) está aumentado em níveis sistêmicos na obesidade ²⁹. Considerando que o tecido adiposo desempenha funções autócrinas e parácrinas, a produção local de angiotensina aumentada na obesidade contribui para o aumento da ativação do SRAA em níveis sistêmicos ⁴⁶. Além disso, em estudo com camundongos obesos, Yasue e col. ⁴⁷ observaram que estes animais apresentaram excesso de tecido adiposo e concentração plasmática elevada dos componentes do SRAA, acompanhados de consequências sistêmicas, como a hipertensão arterial.

A Ang II é formada a partir do angiotensinogênio e angiotensina I, via renina e enzima conversora de angiotensina (ECA) ²⁹. O angiotensinogênio (AGT) é produzido, em sua maior parte, pelo fígado e logo após é liberado na circulação sanguínea. Subsequentemente, o AGT é convertido em angiotensina I, por meio da

ação da renina (produzida pela junção justaglomerular). A ECA então converte a angiotensina I em angiotensina II ⁴⁸. Ademais, outros tecidos demonstram produção local de angiotensina II, tais como os tecidos renal, hepático, cardíaco, adiposo, sanguíneo e muscular esquelético ^{49,50}.

A AngII desempenha suas funções por intermédio de dois tipos de receptores, tipo 1 (AT1) e tipo 2 (AT2), embora a maioria dessas funções seja mediada pelo AT1 ²¹. Por meio do acoplamento com esses receptores, a angiotensina II envia sinalizações para diferenciação, proliferação, sinalização molecular, processos inflamatórios e estresse oxidativo ^{48,51}.

Angiotensina II e músculo esquelético

A regulação do tecido muscular esquelético é regida por um processo balanceado e dinâmico de reações anabólicas e catabólicas de proteínas ⁵². Em determinadas condições patológicas, esse equilíbrio entre a síntese e a quebra de proteínas pode ser afetado, repercutindo em desequilíbrio na manutenção do tecido, gerando perda progressiva de massa muscular e força, fenômeno denominado atrofia ^{52,53}.

Em alguns estados patológicos associados à perda de massa muscular, como insuficiência cardíaca congestiva, câncer ^{54,55,56} e doença renal crônica ^{22,56,57}, ocorre ativação clássica do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) ⁵⁸. A ativação clássica desse sistema tem sido relacionada, principalmente, ao aumento nos níveis de angiotensina II, com atrofia do músculo esquelético. Estudos relatam que a angiotensina II pode provocar miopatia esquelética por meio da geração de espécies reativas de oxigênio, degradação proteica e apoptose ^{54,59,60}. Em ratos, foi verificado que a angiotensina II estimula a proteólise muscular esquelética por meio da ativação de dois principais mecanismos ^{20,22,61}, caspase-3 e o sistema ubiquitina-proteossoma, sinalizadores moleculares de degradação proteica e consequente atrofia muscular.

A AngII também pode modular as proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK). As MAPK incluem quatro subfamílias, das quais três já estão bem caracterizadas: ERK, JNK e p-38 ^{62,63,64}. No músculo esquelético, estudos relatam que as ERKs estão envolvidas com a expressão de genes que desencadeiam a síntese proteica ⁶⁵, sugerindo que sua sinalização estimula processo de hipertrofia

no tecido ⁶⁶. Por outro lado, a inibição da ERK diminui o tamanho do miotubo, aumenta a degradação de proteínas e reduz a expressão de proteínas específicas de fibras rápidas, induzindo fenótipo de fibra muscular lenta ⁶⁷. Em contraste, a ativação da p38-MAPK e da JNK ⁶⁸ está mais associada com respostas celulares a diversos tipos de estresse ^{27,28}, induzindo atrofia ⁶⁹ e desencadeando efeitos pró-fibróticos no músculo esquelético ²⁴.

Além disso, também por meio da ativação do receptor AT1, Ang II é um potente indutor da expressão de proteínas da matriz extracelular, tais como fibronectina, colágeno, TGF- β (fator de crescimento transformador-beta) e CTGF (fator de crescimento do tecido conjuntivo) ^{70,71}. Em mioblastos, essa resposta pró-fibrótica depende da ativação da p38-MAPK e da geração de espécies reativas de oxigênio pela NADPH oxidase ²⁴. As doenças fibróticas são tipicamente caracterizadas por excesso de tecido conjuntivo e deposição de matriz extracelular, que se opõem à regeneração normal em diferentes tecidos. Assim, o aumento acentuado nos níveis de angiotensina II também tem sido associado à patogênese de doenças fibróticas, com alterações em vários tecidos, como o hepático, o renal e o muscular ^{53,70,72}.

Fármacos da família *Sartans* ⁷³, pertencentes à classe de bloqueadores dos receptores de angiotensina (BRAs) têm sido amplamente utilizados em estudos sobre a atuação do sistema-renina-angiotensina-aldosterona. Estes fármacos bloqueiam a ligação da angiotensina II com os receptores AT1, AT2, AT4 em diversos tecidos. Além disso, este bloqueio é independentemente da atuação da ECA ou de quimases, enzimas envolvidas na produção de AngII ⁷⁴. Em modelo genético de distrofia muscular, por exemplo, o tratamento com losartan, bloqueador do receptor AT1, inibiu a via das MAPK e o TGF- β e, conseqüentemente, reduziu a fibrose na musculatura esquelética ²⁶. Em modelo experimental de obesidade, camundongos alimentados com dieta rica em gordura e tratados com o fármaco olmesartan, da classe dos BRAs, apresentaram melhora da capacidade para realização de exercícios físicos, além de melhora da função mitocondrial e redução do estresse oxidativo no músculo esquelético ³¹.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a influência do bloqueio do receptor de angiotensina II sobre vias sinalizadoras envolvidas na modulação do fenótipo muscular em ratos submetidos à dieta hiperlipídica.

Objetivos específicos

- Caracterizar o quadro de obesidade nos animais e identificar distúrbios metabólicos causados pela dieta hiperlipídica;
- Avaliar a morfologia geral, mensurar as áreas seccionais transversas das fibras musculares e quantificar a fração intersticial de colágeno nos músculos sóleo e gastrocnêmio (porção branca);
- Avaliar a expressão de proteínas relacionadas à angiotensina II (receptor AT1) e à modulação do fenótipo muscular (JNK).
- Verificar se o tratamento com losartan, bloqueador do receptor AT1, modula o fenótipo muscular.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento experimental

Foram utilizados ratos *Wistar* machos (n=48), com 30 dias de idade, procedentes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” campus de Botucatu/SP, Brasil. Os animais foram mantidos nas seguintes condições: gaiolas individuais de polipropileno com tampas de arame cromado forradas com sabugo de milho esterilizado; temperatura ambiente ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade controlada ($55 \pm 5\%$) e ciclos de iluminação de 12 horas.

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (protocolo 1105/2014) e também pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMS (protocolo 637/2014).

O período experimental teve duração total de 20 semanas. Inicialmente, os animais foram distribuídos em dois grupos: controle (C) e dieta hiperlipídica (DH). O grupo C foi tratado com dieta normolipídica e os animais do grupo DH foram alimentados com dieta hiperlipídica. Após a 16ª semana de intervenção dietética, cada grupo foi subdividido em dois: C e C+Los; DH e DH+Los (Figura 1). Os grupos C e DH continuaram recebendo as respectivas dietas durante mais quatro semanas. Durante o mesmo período, os grupos C+Los e DH+Los, além do suporte nutricional, foram tratados com losartan, fármaco antagonista de receptores AT1, na dosagem diária de 30 mg/kg de massa corporal⁷⁵. O medicamento foi acrescentado à água ingerida pelos animais. Os procedimentos experimentais estiveram de acordo com “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*”, publicado pelo “*U. S. National Institutes of Health*”⁷⁶. Os animais tiveram livre acesso à ração e à água. A ingestão alimentar foi mensurada diariamente e a massa corporal (MC) uma vez por semana. No período entre a 16ª e a 20ª semana de experimento, foi realizado o controle da ingestão hídrica dos animais grupos C+Los e DH-Los devido à adição do fármaco Losartan.

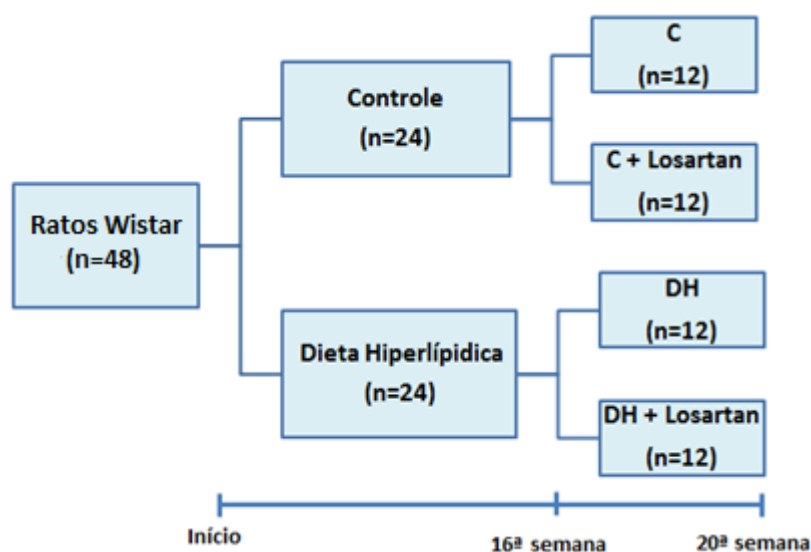


Figura 1. Delineamento Experimental.

Composição das dietas

Os animais dos grupos C e C+Los receberam ração normolipídica. Já os animais dos grupos DH e DH+Los foram submetidos à dieta hiperlipídica. As duas rações foram preparadas no Dietário da Unidade de Pesquisa Experimental - UNIPLEX - Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp e continham os seguintes ingredientes-base: farelo e casca de soja, milho, dextrina, óleo de soja e palmítico e núcleo vitamínico e mineral. As dietas foram elaboradas de acordo com protocolos de trabalhos prévios^{77,78}. Resumidamente, a dieta normolipídica foi composta por 34,3% de proteína, 57,1% de carboidrato, 8,6% de gordura (3,3% de lipídeos insaturados e 5,3% de saturados), tendo o valor calórico de 2,93 kcal/g. A dieta hiperlipídica foi constituída de 24,0% de proteína, 53,3% de carboidrato e 22,7% de gordura (8,0% de lipídios insaturados e 14,7% de lipídeos saturados), valor calórico de 3,64 kcal/g.

Eutanásia dos animais e coleta de tecidos

Após o período experimental, os animais foram mantidos em jejum por período de 12 horas, submetidos à anestesia intraperitoneal com cloridrato de cetamina (80 mg/Kg; Dopalen®, Sespo Indústria e Comércio Ltda – Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil) e xilazina (5 mg/Kg; Anasedan®, Sespo Indústria e Comércio Ltda – Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil). A seguir,

foi mensurado o comprimento nasoanal dos animais e realizada a eutanásia por decapitação. O sangue foi coletado e, a seguir, centrifugado em temperatura ambiente a 3000 rpm, por 10 min, para obtenção de soro. Os músculos gastrocnêmio e sóleo de ambos os membros posteriores foram dissecados, pesados, separados em amostras, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C, estado em que permaneceram até o momento das análises. Posteriormente, foi executada laparotomia mediana para remoção de tecidos adiposos brancos dos compartimentos retroperitoneal, epididimal e visceral⁷⁵.

Na última semana de experimento, um animal do grupo DH+Losartan sofreu morte súbita de causa inconclusiva.

Para avaliação murinométrica, foram calculados o índice de adiposidade ($\Sigma DG \times 100/MC$, sendo ΣDG : somatória dos depósitos de gordura retroperitoneal, epididimal e visceral; MC: massa corporal) e o índice de Lee ($\sqrt[3]{MC}/CR$, sendo MC = massa corporal; CR = Comprimento nasoanal do rato)⁷⁹.

A ingestão calórica foi calculada pela seguinte fórmula: ingestão alimentar semanal multiplicada pelo valor calórico de cada dieta. Com a finalidade de analisar a capacidade de conversão da energia alimentar consumida em massa corporal, foi considerado a eficiência alimentar (EA), obtida a partir da relação entre variação ponderal total (g) e a energia total ingerida pelos animais: $MCf - MCi \times 1000/CCt$ (MCf = Massa corporal final; MCi = Massa corporal inicial; CCt = Consumo calórico total)⁷⁹.

Perfil bioquímico sérico

Foram analisados os níveis séricos de triglicerídeos, colesterol total e frações (LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade; HDL: Lipoproteína de Alta Intensidade), proteína total e albumina por método enzimático com kits específicos (Kovalent diagnosis, Kovalent do Brasil Ltda., Rio de Janeiro/RJ). A concentração sérica de VLDL (Lipoproteínas de muito baixa densidade) foi obtida dividindo-se a concentração de triglicerídeos por cinco. Já a fração não-HDL foi obtida pelo seguinte cálculo: não-HDL = concentração de colesterol total – concentração de HDL⁸⁰.

Análise histológica da musculatura esquelética

Fragmentos dos músculos sóleo e a porção branca (superficial) do gastrocnêmio foram utilizados para obtenção de cortes histológicos transversais (espessura de 10 µm) em criostato a -20 °C. Cortes corados pela técnica de hematoxilina e eosina foram utilizados para análise de morfologia geral e mensuração da área seccional transversa das fibras musculares esqueléticas. Segundo critério preconizado por Dubowitz ⁸¹, foram avaliadas, pelos menos, 200 fibras por amostra muscular. Além disso, outros cortes histológicos obtidos das mesmas amostras musculares foram corados com *Picrosirius Red* ⁸² para quantificação da fração intersticial de colágeno. Para esta análise, foram avaliados pelo menos 20 campos e não foram incluídas regiões perivasculares. As mensurações foram realizadas utilizando-se microscópio *Leica* DM5500B (Wetzlar, Alemanha) acoplado ao sistema *Leica* Application Suite version 4.0.0 (Heerbrugg, Suíça) de análise de imagens computadorizado.

Western blot

Foi analisada a expressão proteica do receptor AT1 e da MAPK JNK (nas formas total e fosforilada) ^{75,83} no músculo sóleo e na porção branca do músculo gastrocnêmio. Resumidamente, fragmento muscular foi homogeneizado em tampão de extração contendo NaCl 100 mM, TritonX-100 1% (v/v), desoxicolato de sódio 0,5% (m/v), dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1 % (m/v), glicerol 10% (v/v) Tris 10 mM (ph 7,4), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM, ácido etilenoglicol tetra-acético (EGTA) 1mM, ortovanadato de sódio 1 mM, NaF 10 mM e inibidores de proteases (código P2714, Sigma-Aldrich) e alíquotas foram armazenadas a -80 °C. Uma das alíquotas foi utilizada para quantificação de proteína pelo método de Bradford ⁸⁴. As amostras foram acrescidas de tampão Laemmli (Sigma S3401), na proporção 1:1, e posteriormente aquecidas a 100 °C por 5 minutos em banho seco. Para cada proteína alvo, foi realizada eletroforese de proteínas (50 µg cada amostra) em gel de poliacrilamida a 4 °C (30 min a 50 V e 2 h a 120 V). Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em sistema de transferência úmido por 90 min a 120 V, a 4 °C. A seguir, a membrana foi incubada em solução de leite desnatado 5% em temperatura ambiente por 1 h (bloqueio) para

prevenir ligações inespecíficas com os anticorpos primário e secundário. Posteriormente, a membrana foi lavada com TBST (tampão contendo Tris, NaCl e Tween 20) e incubada durante a noite, a 4 °C, com anticorpo primário específico para cada proteína. No dia subsequente, a membrana foi lavada com TBST e incubada à temperatura ambiente por 90 min com anticorpo secundário (conjugado a peroxidase) adequado para ligação com o anticorpo primário utilizado, de acordo com recomendação do fabricante. A seguir, após incubação da membrana com o reagente quimioluminescente *Luminata™ Classico Western HRP Substrate* (Millipore Corporation, Billerica, USA) para detecção do anticorpo ligado à membrana, foi obtida a autorradiografia.

Após obtenção do filme, a membrana foi incubada com *Restore™ Western Blot Stripping Buffer* (Thermo Scientific, Rockford, USA) para remoção dos anticorpos ligados à membrana. A seguir, foi realizado novamente o processo de bloqueio e a membrana foi incubada durante a noite, a 4 °C, com anticorpo primário para a proteína constitutiva gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). O procedimento prosseguiu da mesma forma como descrito anteriormente até a detecção do sinal e obtenção da autorradiografia.

Os filmes foram digitalizados e as bandas quantificadas por densitometria utilizando-se o programa Gel Pro 3.1. Os resultados obtidos para as proteínas alvo foram normalizados pelos resultados da proteína constitutiva GAPDH.

Anticorpos primários (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA): anti-AT1 (sc-57036); anti-p-JNK (sc-6254), anti-JNK total (sc-137019), anti-GAPDH (sc-32233).

Anticorpo secundário (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA): anti-mouse (sc-2005).

Análise estatística

Os dados foram apresentados em média e desvio padrão. Para comparação entre os grupos, foi realizada análise de variância (ANOVA) de duas vias complementada com *post hoc* de Tukey. O nível de significância considerado foi de 5%.

RESULTADOS

Na tabela 1, estão apresentadas as variáveis nutricionais dos ratos. A ingestão alimentar total foi menor nos grupos submetidos à dieta hiperlipídica (DH e DHL) quando comparados aos seus respectivos controles (C e CL). A ingestão calórica não diferiu entre os grupos. A eficiência alimentar foi maior nos grupos DH e DHL quando comparados aos grupos C e CL, respectivamente; adicionalmente, no grupo DHL, esta variável apresentou valores significativamente mais elevados que no grupo DH. A ingestão de proteínas foi menor nos grupos submetidos à dieta hiperlipídica (DH e DHL) quando comparados aos seus respectivos controles (C e CL). A ingestão de gordura saturada e insaturada foi significativamente maior nos grupos submetidos à dieta hiperlipídica (DH e DHL) quando comparados aos seus respectivos controles (C e CL).

Tabela 1. Variáveis nutricionais.

Variável	C (n=12)	DH (n=12)	CL (n=12)	DHL (n=11)
Ingestão alimentar total (g)	3717 ± 370	2949 ± 274*	3644 ± 415	2877 ± 290†
Ingestão calórica (kcal)	81,9 ± 7,8	80,7 ± 7,2	80,3 ± 8,8	78,7 ± 7,6
Eficiência Alimentar (g/kcal)	26,8 ± 2	32,2 ± 4,2*	28,4 ± 0,9	35,1 ± 4,6†#
Ingestão proteínas (g)	1275 ± 127	707,6 ± 65,8*	1250 ± 143	690 ± 69,5†
Ingestão de gordura insaturada (g)	123 ± 12,2	235 ± 21,9*	120 ± 13,7	230 ± 23,2†
Ingestão de gordura saturada (g)	197 ± 19,6	433 ± 40,3*	193 ± 22,0	422 ± 42,6†

C: Controle; CL: Controle Losartan; DH: Dieta Hiperlipídica; DHL: Dieta Hiperlipídica + Losartan. Valores expressos pela média ± desvio padrão. Anova de duas vias com *post hoc* de Tukey. *p<0,05 vs Grupo Controle; # p<0,05 vs Grupo Dieta Hiperlipídica; † p<0,05 vs grupo Controle Losartan.

Na tabela 2, estão expostas as variáveis anatômicas e murinométricas. A massa corporal e o índice de adiposidade foram significativamente maiores nos grupos submetidos à dieta hiperlipídica (DH e DHL) quando comparados aos seus respectivos controles (C e CL). O índice de Lee foi semelhante entre os grupos. Os depósitos de gordura retroperitoneal, visceral e epididimal foram significativamente maiores nos grupos submetidos à dieta hiperlipídica (DH e DHL) quando comparados aos seus respectivos controles (C e CL). A massa do músculo sóleo esquerdo, em valores absolutos e normalizados pela massa corporal (Sóleo/MC) ou pelo comprimento da tíbia (Sóleo/tíbia), foi similar entre os grupos. Já para o músculo gastrocnêmio esquerdo, em valores absolutos, o grupo submetido à dieta hiperlipídica (DH) apresentou maior massa quando comparado ao seu respectivo controle (C); não houve diferença entre os demais grupos para esta variável. Em valores relativos, com normalização pela massa corporal ou pelo comprimento da tíbia (gastrocnêmio/MC e gastrocnêmio/tíbia), a massa do músculo gastrocnêmio esquerdo não diferiu significativamente entre os grupos.

Tabela 2. Variáveis anatômicas e murinométricas.

Variável	C (n=12)	DH (n=12)	CL (n=12)	DHL (n=11)
Massa corporal (g)	451,1± 55,8	507,1±61,8*	456,9±47,4	517,8±47,3†
Adiposidade (%)	3,5± 0,7	5,2±1,4*	3,6±1,2	5,5±1,4†
Índice de Lee (g ³ /cm)	0,28 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,29 ± 0,01
Gordura retroperitoneal	5,5 ± 1,8	11,5 ± 5,1*	6,4 ± 3,2	11,4 ± 4,3†
Gordura visceral	3,3 ± 1,2	5,1 ± 1,8*	3,3 ± 1,1	6,1 ± 1,7†
Gordura epididimal	7,0 ± 2,3	10,2 ± 3,1*	6,9 ± 2,8	11,4 ± 4,2†
Sóleo (g)	0,22 ± 0,04	0,24 ± 0,03	0,22 ± 0,03	0,24 ± 0,03
Gastrocnêmio (g)	2,69 ± 0,34	2,91 ± 0,37*	2,66 ± 0,26	2,89 ± 0,29
Sóleo /MC (mg/g)	0,49 ± 0,04	0,48 ± 0,05	0,49 ± 0,04	0,45 ± 0,05
Gastrocnêmio/MC (mg/g)	5,90 ± 0,29	5,75 ± 0,49	5,83 ± 0,34	5,60 ± 0,5
Sóleo/Tíbia (mg/mm)	5,16 ± 0,82	5,53 ± 0,68	5,16 ± 0,53	5,41 ± 0,64
Gastrocnêmio/Tíbia (mg/mm)	137,15 ± 8,67	131,24 ±11,37	136,43 ± 10,90	129,52 ± 12,70

C: Controle; CL: Controle Losartan; DH: Grupo Dieta Hiperlipídica; DHL: Dieta Hiperlipídica + Losartan. Valores expressos pela média ± desvio padrão. Anova de duas vias com *post hoc* de Tukey. *p<0,05 vs grupo Controle; # p<0,05 vs grupo Dieta Hiperlipídica; † p<0,05 vs grupo Controle Losartan.

Na tabela 3, foram descritos dados sobre o perfil bioquímico sérico. Para todas as variáveis avaliadas (Colesterol total, triglicerídeos, VLDL, LDL, HDL, Não-HDL, proteína total e albumina), não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 3. Perfil bioquímico sérico.

Variável	C (n=12)	DH (n=12)	CL (n=12)	DHL (n=11)
Triglicerídeos (mg/dL)	48,25 ± 12,03	48,45 ± 16,56	57,64 ± 15,65	50,16 ± 12,19
Colesterol Total (mg/dL)	71,99 ± 13,70	74,67 ± 7,53	74,05 ± 6,38	78,40 ± 13,94
HDL (mg/dL)	29,36 ± 3,65	27,21 ± 4,00	30,16 ± 2,46	29,73 ± 3,84
VLDL (mg/dL)	9,65 ± 2,41	9,69 ± 3,31	11,53 ± 3,13	10,03 ± 2,44
LDL (mg/dL)	32,20 ± 12,38	33,60 ± 10,07	33,45 ± 6,74	34,83 ± 6,91
Não-HDL (mg/dL)	43,58 ± 16,64	46,90 ± 5,87	35,55 ± 26,60	46,13 ± 8,28
Proteína total (g/dL)	5,42 ± 0,33	5,47 ± 0,21	5,27 ± 0,25	5,44 ± 0,21
Albumina (g/dL)	2,94 ± 0,21	3,02 ± 0,20	2,96 ± 0,16	3,07 ± 0,17

C: Controle; CL: Controle Losartan; DH: Dieta Hiperlipídica; DHL: Dieta Hiperlipídica + Losartan. Valores expressos pela média ± desvio padrão. Anova de duas vias.

Na figura 2, está apresentada a avaliação morfométrica dos músculos esqueléticos gastrocnêmio e sóleo. A área seccional das fibras musculares do músculo gastrocnêmio (C 3.540 ± 288; DH 3.938 ± 342; CL 3.827 ± 424; DHL 4.176 ± 515 μm^2) foram maiores nos grupos submetidos à dieta hiperlipídica (DH e DHL) quando comparados aos seus respectivos controles (C e CL). A área seccional das fibras musculares do músculo sóleo (C 3.452 ± 766; DH 3.943 ± 830; CL 3.569 ± 713; DHL 3.539 ± 843 μm^2) foram semelhantes entre os grupos.

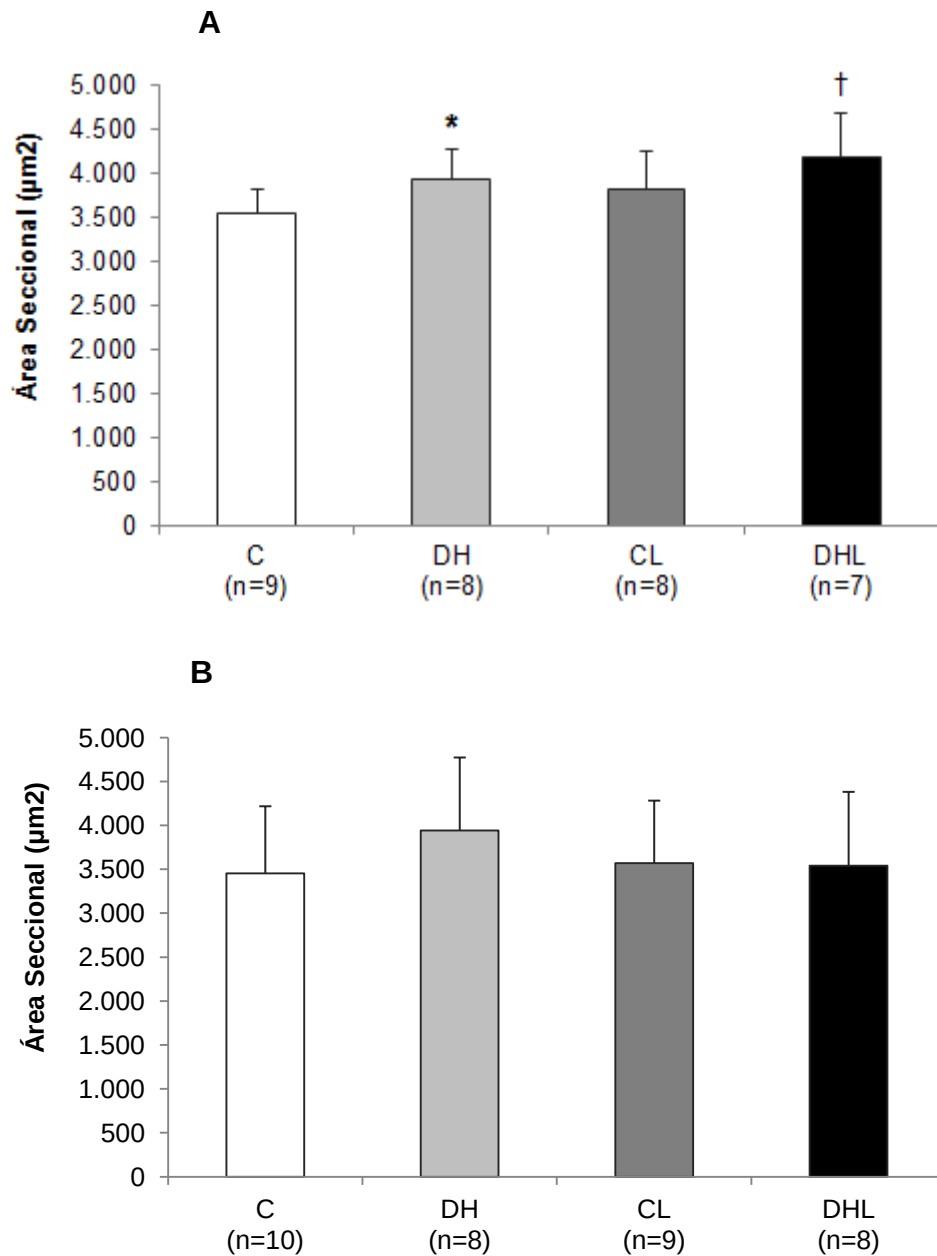


Figura 2. Avaliação morfométrica do tecido muscular esquelético. A: Área seccional do músculo gastrocnêmio (μm^2); B: Área seccional do músculo sóleo (μm^2). C: Controle; CL: Controle Losartan; DH: Dieta Hiperlipídica; DHL: Dieta Hiperlipídica + Losartan. Valores expressos pela média $\pm$ desvio padrão. Anova de duas vias com *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ vs grupo Controle; # $p < 0,05$ vs grupo Dieta Hiperlipídica; † $p < 0,05$ vs grupo Controle Losartan.

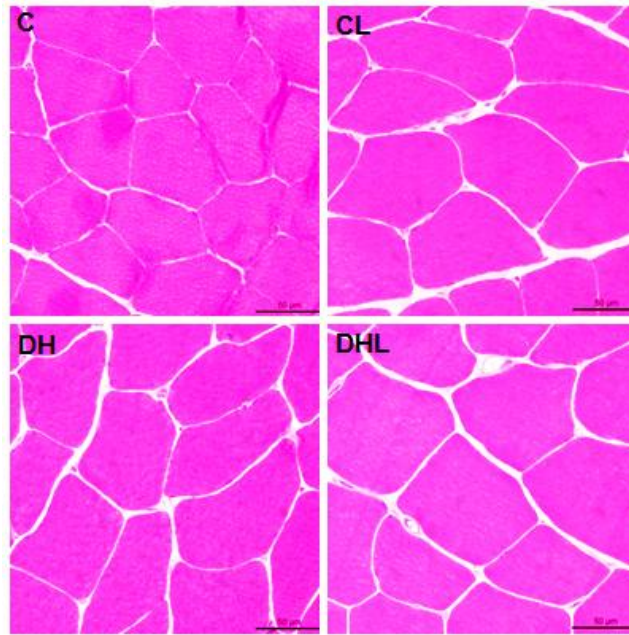


Figura 3. Cortes histológicos transversais do músculo esquelético gastrocnêmio corados com hematoxilina-eosina. C: Controle; CL: Controle Losartan; DH: Dieta Hiperlipídica; DHL: Dieta Hiperlipídica + Losartan. Aumento: 400x.

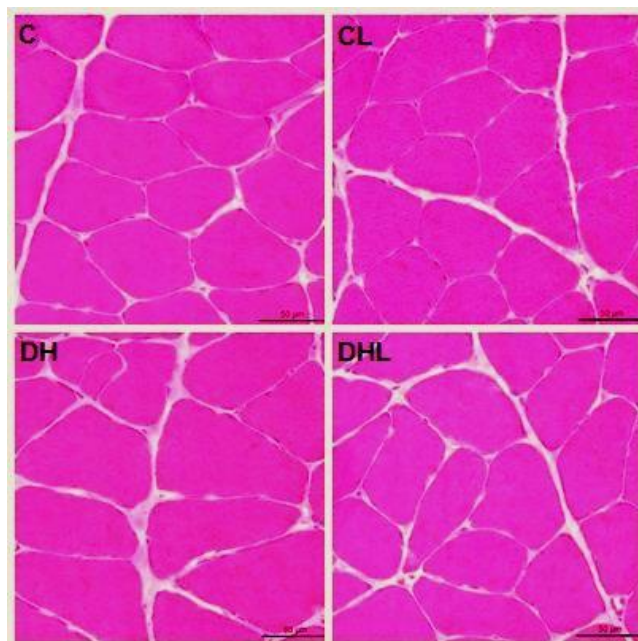


Figura 4. Cortes histológicos transversais do músculo esquelético sóleo corados com hematoxilina-eosina. C: Controle; CL: Controle Losartan; DH: Dieta Hiperlipídica; DHL: Dieta Hiperlipídica + Losartan. Aumento: 400x.

Na figura 5, está apresentada a fração intersticial de colágeno nos músculos gastrocnêmio e sóleo. A fração intersticial de colágeno no músculo gastrocnêmio (C $14,92 \pm 3,48$; DH $14,79 \pm 2,65$; CL $14,47 \pm 1,56$; DHL $11,87 \pm 4,70$ %) foi semelhante entre os grupos. A fração intersticial de colágeno no músculo sóleo (C $20,74 \pm 2,95$; DH $17,42 \pm 2,20$; CL $19,90 \pm 2,65$; DHL $14,38 \pm 3,44$ %) foi menor no grupo submetido à dieta hiperlipídica + losartan (DHL) quando comparado ao seu respectivo controle (CL).

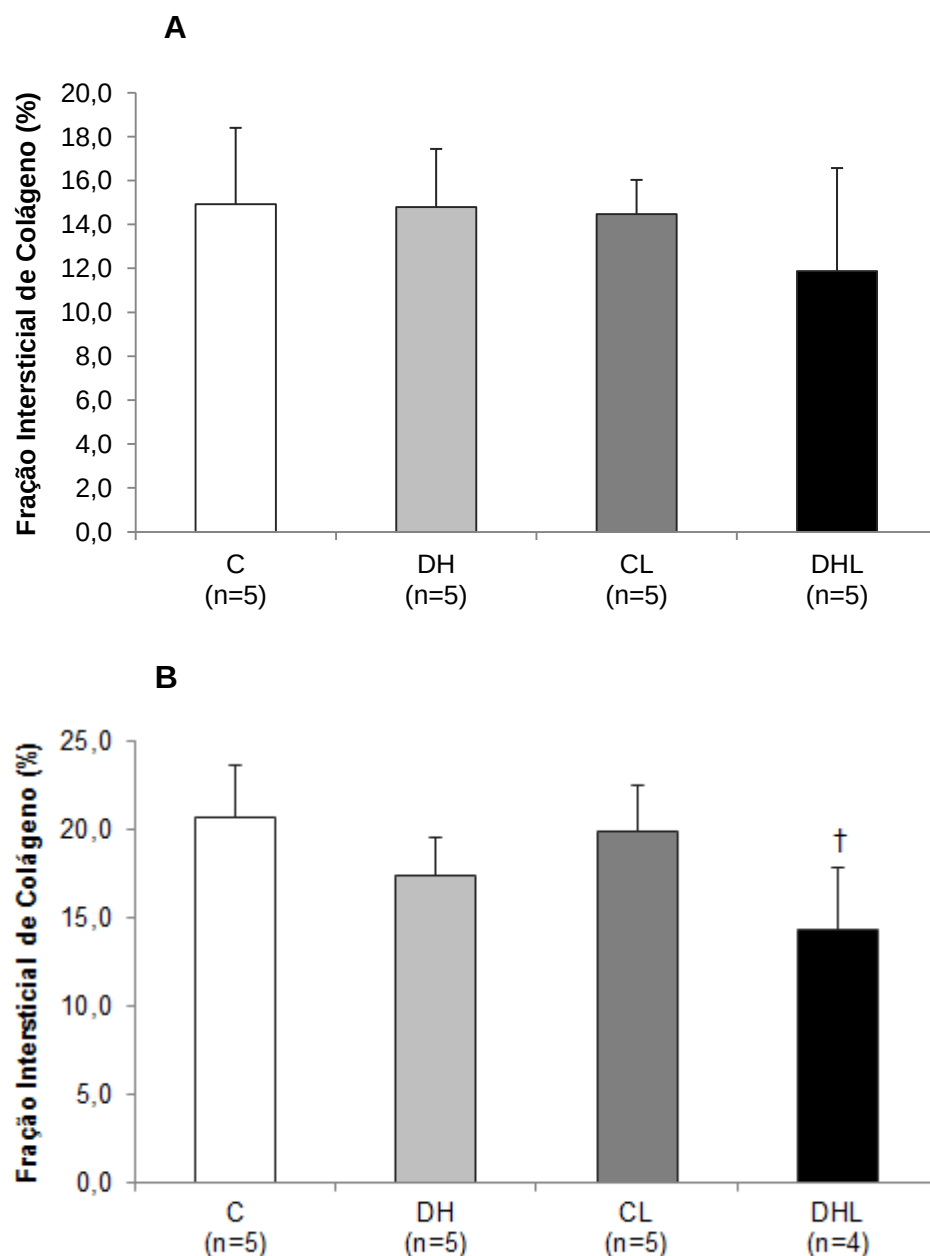


Figura 5. Fração Intersticial de Colágeno (FIC, %) avaliada em cortes histológicos corados com *Picrosirius red*. *A*: FIC no músculo gastrocnêmio; *B*: FIC no músculo sóleo. C: Controle; CL: Controle Losartan; DH: Dieta Hiperlipídica; DHL: Dieta Hiperlipídica + Losartan. Valores expressos pela média $\pm$ desvio padrão. Anova de duas vias com *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ vs Grupo Controle; # $p < 0,05$ vs Grupo Dieta Hiperlipídica; † $p < 0,05$ vs grupo Controle Losartan.

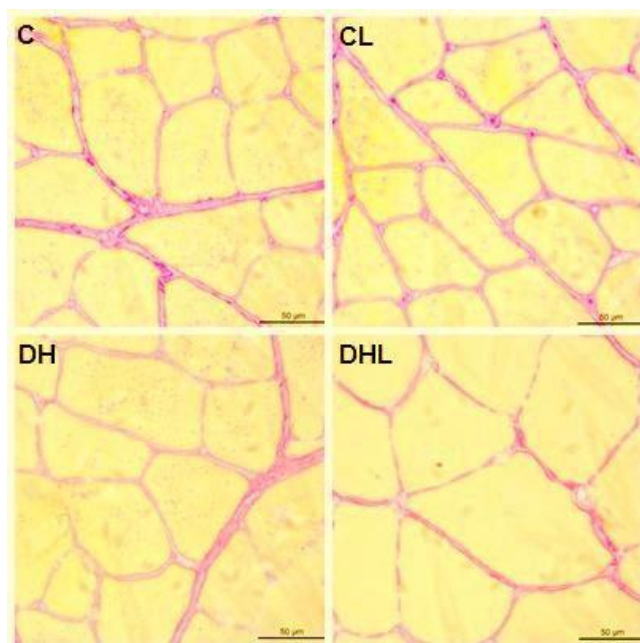


Figura 6. Cortes histológicos transversais do músculo esquelético gastrocnêmio corados com *Picrosirius Red*. C: Controle; CL: Controle Losartan; DH: Dieta Hiperlipídica; DHL: Dieta Hiperlipídica + Losartan. Aumento: 400x.

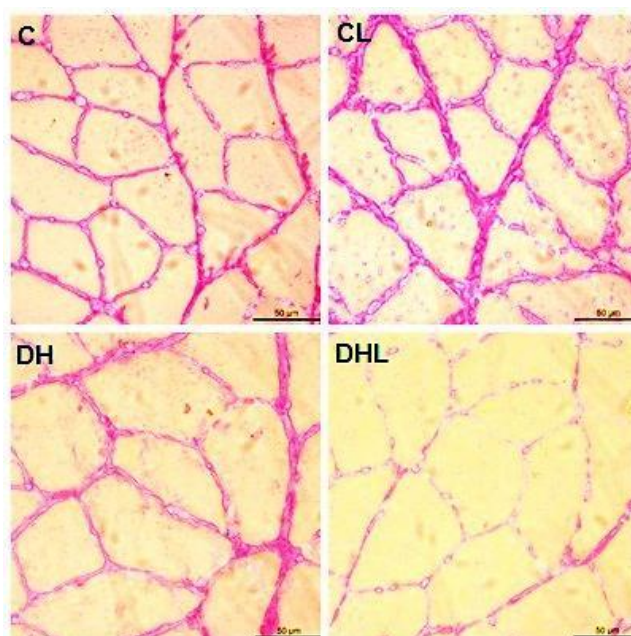


Figura 7. Cortes histológicos transversais do músculo esquelético sóleo corados com *Picrosirius Red*. C: Controle; CL: Controle Losartan; DH: Dieta Hiperlipídica; DHL: Dieta Hiperlipídica + Losartan. Aumento: 400x.

Na figura 8, estão expostos os dados de expressão da proteína JNK (formas total e fosforilada) no músculo gastrocnêmio e sóleo. No músculo gastrocnêmio, a relação p-JNK/JNK total (C $1,00 \pm 0,14$; DH $0,78 \pm 0,17$; CL $0,99 \pm 0,13$; DHL $0,82 \pm 0,20$ unidades arbitrárias) foi menor nos grupos submetidos à dieta hiperlipídica (DH e DHL) quando comparados aos seus controles (C e CL). No músculo sóleo, a expressão de p-JNK/JNK total (C $1,00 \pm 0,36$; DH $1,00 \pm 0,47$; CL $1,19 \pm 0,21$; DHL $1,11 \pm 0,54$ unidades arbitrárias) foi semelhante entre os grupos. A expressão de JNK total/GAPDH foi semelhante entre os grupos tanto no músculo gastrocnêmio (C $1,00 \pm 0,37$; DH $1,59 \pm 0,57$; CL $1,77 \pm 1,31$; DHL $1,55 \pm 0,44$ unidades arbitrárias) quanto no músculo sóleo (C $1,00 \pm 0,46$; DH $1,23 \pm 0,40$; CL $0,91 \pm 0,24$; DHL $1,10 \pm 0,50$ unidades arbitrárias).

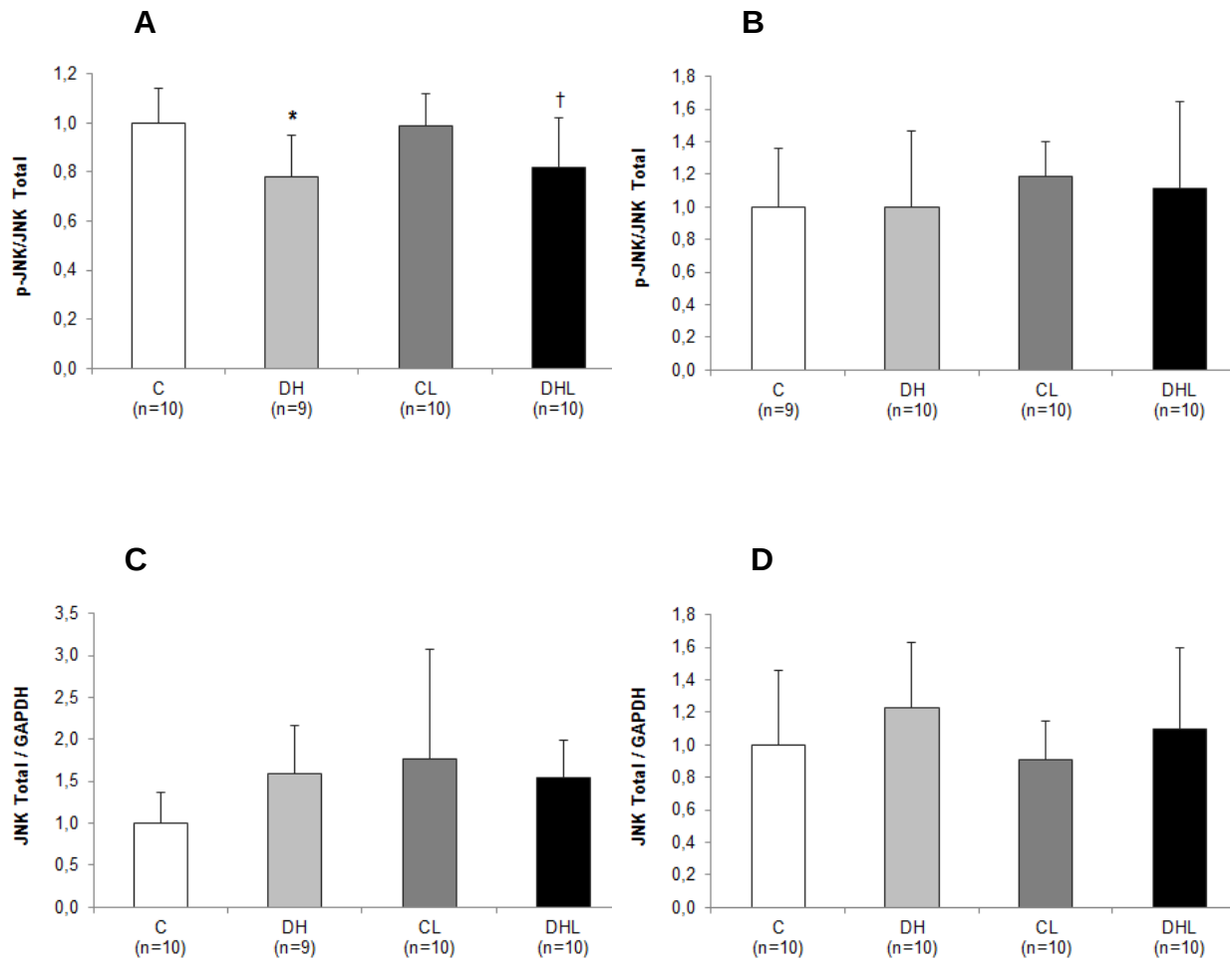


Figura 8. Expressão proteica de p-JNK (A e B) e JNK total (C e D) nos músculos gastrocnêmio e sóleo, respectivamente. C: Controle; CL: Controle Losartan; DH: Dieta Hiperlipídica; DHL: Dieta Hiperlipídica + Losartan. Valores expressos pela média $\pm$ desvio padrão. Anova de duas vias com *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ vs Grupo Controle ; # $p < 0,05$ vs Grupo Dieta Hiperlipídica; † $p < 0,05$ vs grupo Controle Losartan.

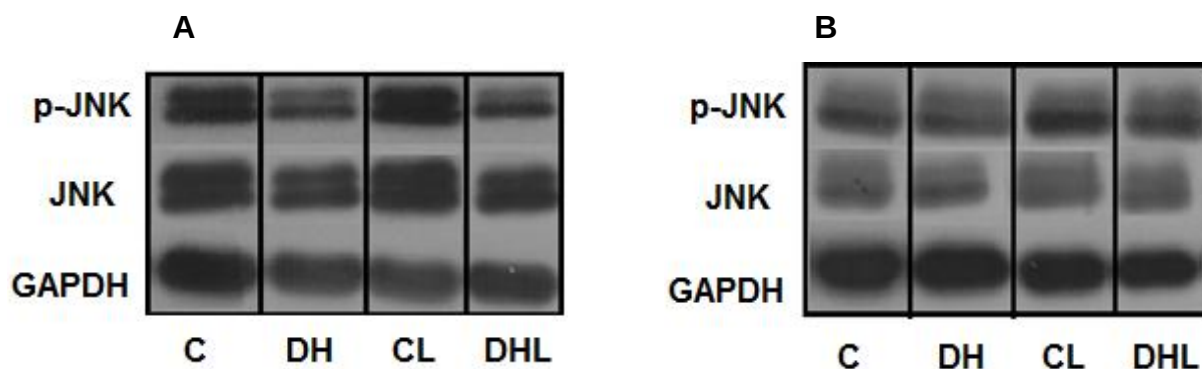


Figura 9. Bandas representativas (técnica da *Western blot*) da expressão proteica de p-JNK e JNK total e da proteína constitutiva GAPDH nos músculos gastrocnêmio (A) e sóleo (B). C: Controle; CL: Controle Losartan; DH: Dieta Hiperlipídica; DHL: Dieta Hiperlipídica + Losartan

Na figura 10, está apresentada a expressão do receptor AT1 no músculo gastrocnêmio (A) e no músculo sóleo (B). No músculo gastrocnêmio (C $1,00 \pm 0,29$; DH $1,75 \pm 0,32$; CL $2,16 \pm 0,48$; DHL $1,38 \pm 0,24$ unidades arbitrárias) a expressão do receptor AT1/GAPDH foi maior no grupo submetido à dieta hiperlipídica (DH) e no grupo (CL) quando comparados ao grupo Controle (C). Adicionalmente, o grupo submetido à dieta hiperlipídica (DHL) apresentou menor expressão de AT1 quando comparado aos grupos (DH e CL) respectivamente. No músculo sóleo, a expressão proteica do AT1 (C $1,00 \pm 0,20$; DH $0,90 \pm 0,24$; CL $1,04 \pm 0,26$; DHL $0,77 \pm 0,29$ unidades arbitrárias) foi menor no grupo submetido à dieta hiperlipídica + losartan (DHL) quando comparado ao grupo (CL).

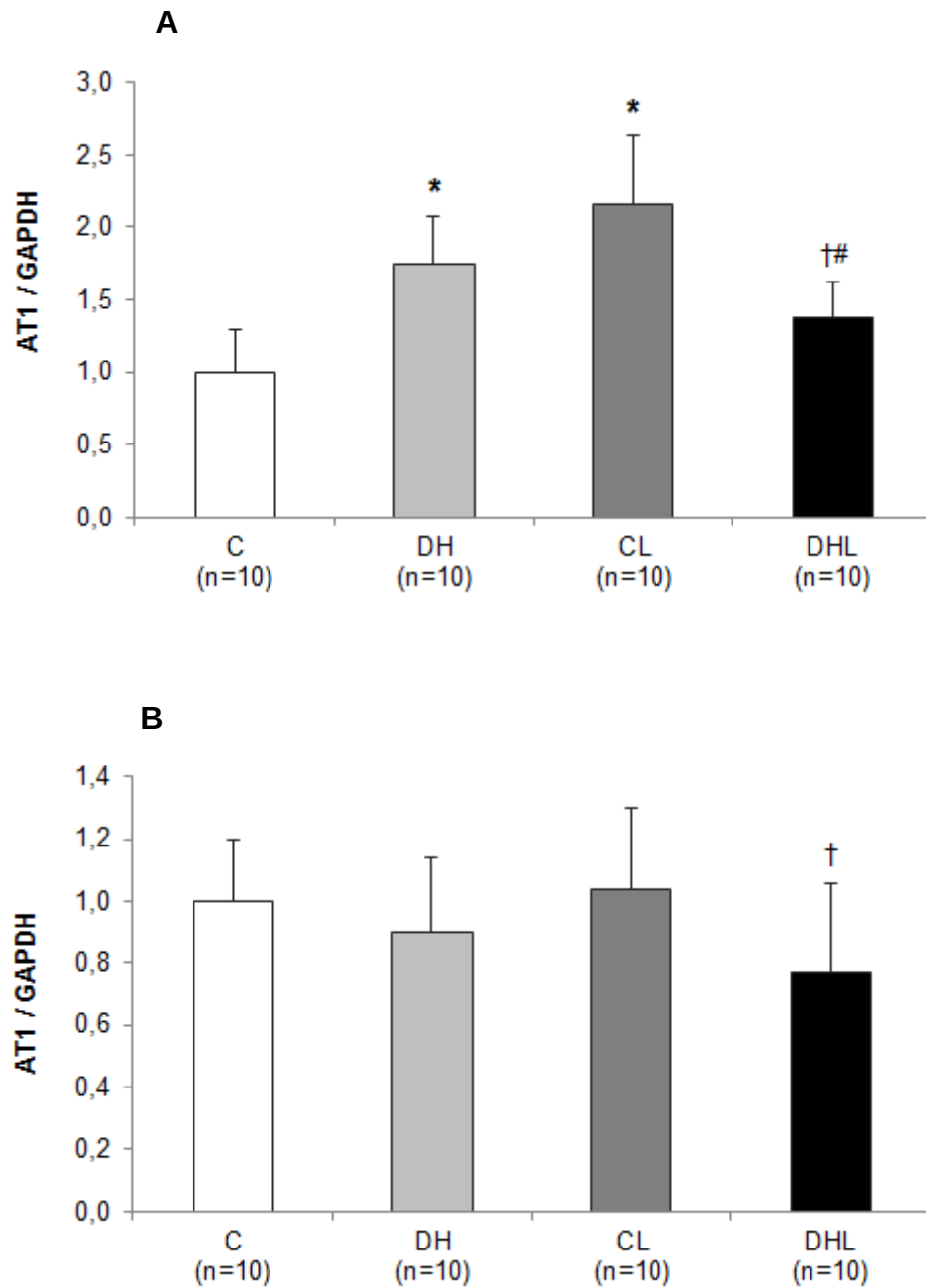


Figura 10. Expressão proteica de AT1 nos músculos gastrocnêmio (A) e sóleo (B). C: Controle; CL: Controle Losartan; DH: Dieta Hiperlipídica; DHL: Dieta Hiperlipídica + Losartan. Valores expressos pela média $\pm$ desvio padrão. Anova de duas vias com *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ vs Grupo Controle; # $p < 0,05$ vs Grupo Dieta Hiperlipídica; † $p < 0,05$ vs grupo Controle Losartan.

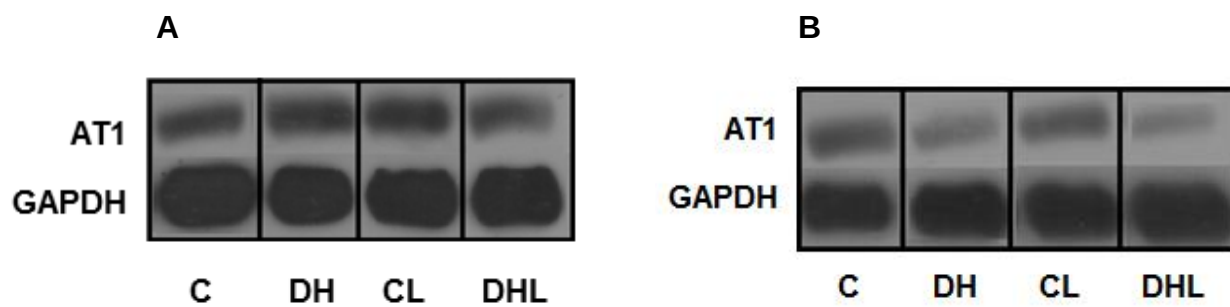


Figura 11. Bandas representativas (técnica da *Western blot*) da expressão proteica de AT1 e da proteína constitutiva GAPDH nos músculos gastrocnêmio (A) e sóleo (B). C: Controle; CL: Controle Losartan; DH: Dieta Hiperlipídica; DHL: Dieta Hiperlipídica + Losartan.

DISCUSSÃO

Neste estudo, foi avaliada a influência do bloqueio do receptor de angiotensina II sobre a via sinalizadora das MAPK e modulação do fenótipo muscular em ratos obesos.

A obesidade foi induzida por dieta hiperlipídica, com discreta predominância de ácidos graxos saturados em relação aos ácidos graxos insaturados. Os grupos submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram menor ingestão alimentar, porém maior massa corporal e maior índice de adiposidade quando comparados aos seus respectivos controles. Outros autores também verificaram maior massa corporal e índice de adiposidade em animais submetidos a dieta rica em gordura e carboidratos^{17,75} ou apenas com sobrecarga de gordura⁸⁵. Da mesma forma, Seo *et al.*⁸⁶ observaram que ratos alimentados por 12 semanas com dieta rica em gordura apresentaram menor ingestão alimentar e maior massa corporal quando comparados ao grupo controle. Interessantemente, Oliveira Jr *et al.*⁷⁵ identificaram maior eficiência alimentar, além de menor ingestão alimentar e maior índice de adiposidade, em animais submetidos à dieta hipercalórica em protocolo experimental de 30 semanas.

O fato dos grupos DH e DHL terem apresentado maior massa corporal e maior índice de adiposidade, apesar de menor ingestão alimentar e ingestão calórica semelhante em relação aos respectivos controles, está diretamente associado à maior eficiência alimentar, maior densidade calórica do alimento que também resulta em maior saciedade no animal, gerando menor ingestão alimentar. A menor ingestão alimentar nos grupos DH e DHL, observada em nosso estudo, também já foi descrita por outros autores em trabalhos sobre obesidade^{86,87}. Ademais, com o excesso de tecido adiposo, ocorre maior secreção de leptina no organismo, hormônio envolvido na regulação do apetite e do metabolismo energético, o qual pode contribuir para a ocorrência de hipofagia⁸⁶. Além disso, a angiotensina II, que possivelmente está aumentada sistemicamente na obesidade, também pode promover efeitos anorexigênicos no organismo, ocasionando menor consumo de alimentos²⁹.

Por outro lado, alguns estudos demonstraram o impacto das intervenções com bloqueadores do receptor de AngII sobre o perfil biométrico em ratos com obesidade induzida por dieta^{88,89}. Rosseli *et al.*⁸⁸ afirmaram que o tratamento com

losartan promoveu diminuição significativa do peso corporal e da adiposidade em protocolo dietético composto por dieta hiperlipídica com duração de 20 semanas. Em outro trabalho⁸⁹, a administração de telmisartan promoveu diminuição da massa corporal de ratos submetidos à dieta hipercalórica por duas semanas. Contudo, no presente estudo, não verificamos influência do bloqueio da angiotensina II sobre a massa corporal e o índice de adiposidade nos animais submetidos à dieta hiperlipídica. Apesar dos fármacos citados anteriormente pertencerem todos à família dos bloqueadores de receptor de angiotensina, as diferenças relacionadas ao perfil farmacodinâmico/farmacinético desses bloqueadores e ao grau de afinidade dessas drogas com o receptor AT1 podem explicar, pelo menos parcialmente, os resultados divergentes entre os estudos em relação às variáveis biométricas.

Acerca da musculatura esquelética, no presente trabalho, foi verificada a ocorrência de alterações morfológicas nos músculos gastrocnêmio (porção branca) e sóleo. Observamos que a dieta hiperlipídica e o tratamento com losartan atuam de forma diferenciada na musculatura esquelética, dependendo do tipo de fibras (rápidas ou lentas) predominante. Os grupos submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram aumento da área seccional das fibras musculares do gastrocnêmio, porém não houve diferença quanto à área das fibras do músculo sóleo. Adicionalmente, a massa do músculo gastrocnêmio, em valor absoluto, foi maior no grupo alimentado com dieta hiperlipídica. Takada *et al.*³¹ avaliaram a influência do bloqueio do receptor de angiotensina II com olmesartan sobre a musculatura esquelética de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e verificaram diminuição significativa da proporção de fibras do tipo I, mas não observaram alteração significativa da massa muscular e da área seccional das fibras musculares. Em camundongos alimentados com dieta rica em gorduras e sacarose por oito⁹⁰ ou 12⁹¹ semanas, também não foi identificada alteração da massa do músculo gastrocnêmio. Por outro lado, Sishi *et al.*¹⁷ observaram que ratos alimentados com dieta de cafeteria (rica em gorduras e carboidratos) durante 16 semanas apresentaram redução da área seccional das fibras do músculo gastrocnêmio (porção vermelha). É possível que a diferença entre os achados morfológicos da musculatura esquelética dos estudos citados anteriormente esteja relacionada ao tipo de dieta utilizada, à duração do período experimental e ao músculo avaliado.

Na presente pesquisa, contrariando a hipótese inicial, a dieta hiperlipídica não influenciou a fração intersticial de colágeno na musculatura esquelética. Em contraste com os achados do presente trabalho, Pincu *et al.*⁸⁵ verificaram que animais alimentados com dieta rica em gordura apresentaram maior fração intersticial de colágeno associada ao aumento da expressão proteica de TGF- β e colágeno I α na musculatura esquelética. Por outro lado, como esperado, em nosso trabalho verificamos que o tratamento com losartan reduziu a expressão de AT1 e reduziu a fração intersticial de colágeno no músculo sóleo de ratos alimentados com dieta hiperlipídica. O aumento acentuado nos níveis de angiotensina II tem sido associado à patogênese de doenças fibróticas, com alterações em vários tecidos, como o hepático, o renal e o muscular^{53,70,72}. Por meio da ativação do receptor AT1, AngII é um potente indutor da expressão de proteínas da matriz extracelular^{70,71}. Em modelo genético de distrofia muscular, por exemplo, o tratamento com losartan reduziu a fibrose na musculatura esquelética²⁶, resultado semelhante ao obtido no presente estudo.

Em relação às análises moleculares, em nosso trabalho, os animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram diminuição da ativação da JNK e aumento na expressão dos receptores AT1 no músculo gastrocnêmio. O tratamento com losartan, por sua vez, reduziu a expressão de AT1, mas não influenciou a ativação da JNK no músculo gastrocnêmio dos animais alimentados com dieta hiperlipídica.

A JNK constitui uma das quatro subfamílias das MAPK e sua ativação está associada com respostas celulares a diversos tipos de estresse, como ativação inflamatória, estresse oxidativo e aumento de AngII^{27,28,62,68}. Por outro lado, a inibição da JNK pode ocorrer por meio da ação de MAPK fosfatases, principalmente a MKP-1. Apesar desta proteína não ter sido avaliada no presente estudo, outros autores já relataram que o consumo de dieta hiperlipídica foi associado ao aumento da expressão gênica de MKP-1 e consequente redução da fosforilação de MAPK na musculatura esquelética de camundongos⁹².

Interessantemente, em nosso estudo, nos grupos submetidos à dieta hiperlipídica, a diminuição da fosforilação de JNK foi acompanhada do aumento na área seccional das fibras do músculo gastrocnêmio, caracterizando hipertrofia muscular. Nesse sentido, a via sinalizadora PI3K/AKT constitui mecanismo

molecular classicamente envolvido no processo de hipertrofia muscular, uma vez que estimula a síntese proteica ^{91,93}. Esta sinalização pode ser estimulada por diversos fatores, entre eles a insulina, a qual, por meio da interação com seu receptor, promove fosforilação em resíduos de tirosina do substrato do receptor de insulina (IRS-1), com consequente ativação da via PI3K/AKT ⁹⁴. Entretanto, a JNK pode interferir na sinalização normal da insulina por meio da fosforilação em resíduo específico de serina do IRS-1, reduzindo a interação desta proteína com a PI3K ⁹⁵. Assim, é possível que a inibição da JNK verificada no presente trabalho esteja associada à maior ativação da via PI3K/AKT. Podemos, então, sugerir que a hipertrofia observada no músculo gastrocnêmio, no grupo submetido à dieta hiperlipídica, pode ser modulada em parte pela inibição da JNK e não parece estar relacionada com a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona.

Além disso, já foi demonstrado que a ativação da AKT está envolvida no aumento da massa muscular preferencialmente em músculos com predominância de fibras de contração rápida/glicolíticas⁹⁰. Este papel da AKT pode explicar, pelo menos parcialmente, o fato de termos identificado hipertrofia na porção branca do músculo gastrocnêmio (com predominância de fibras rápidas/glicolíticas), mas não termos verificado diferença significativa relação à área seccional transversa das fibras no músculo sóleo (com predominância de fibras lentas/oxidativas).

Ademais, a dieta hiperlipídica promoveu aumento na expressão do receptor AT1 no músculo gastrocnêmio. O tratamento com losartan, por sua vez, reduziu a expressão de AT1 nos músculos gastrocnêmio e sóleo. O aumento da expressão do receptor AT1 pode ser consequência de aumento da disponibilidade de angiotensina II, como mecanismo de *feedback* positivo frente à necessidade de interação hormônio-receptor ⁹⁶. Apesar de não termos avaliado a concentração de angiotensina no presente trabalho, outros estudos já mostraram que a Ang II e outros componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) estão aumentados em níveis sistêmicos na obesidade ²⁹. Por outro lado, quando há o bloqueio de receptores AT1, como no tratamento com Losartan, é possível que o organismo aja de forma compensatória, produzindo mais receptores, na tentativa de vencer este bloqueio. Entretanto, outros autores não encontraram diferença significativa na expressão de receptores AT1 na musculatura esquelética de camundongos submetidos a dieta hiperlipídica e tratamento com olmesartan ³¹.

CONCLUSÃO

Em resumo, a dieta hiperlipídica promove alterações murinométricas compatíveis com condição de obesidade. Em relação à musculatura esquelética, os animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentam aumento da área seccional transversa das fibras do músculo gastrocnêmio, associado à diminuição da ativação da JNK e aumento na expressão dos receptores AT1. Já no músculo sóleo, a dieta hiperlipídica não promove alterações morfológicas ou moleculares significativas. O tratamento com losartan, por sua vez, reduz a expressão de AT1 nos músculo sóleo e gastrocnêmio e reduz a fração intersticial de colágeno no músculo sóleo no grupo alimentado com dieta hiperlipídica. No entanto, o tratamento com losartan não influencia a ativação da JNK no músculo gastrocnêmio.

Assim, podemos concluir que a administração de dieta hiperlipídica promove alterações morfológicas e moleculares de forma diferente em músculos com predominância de fibras lentas ou de fibras rápidas. Além disso, essas alterações são parcialmente moduladas pela angiotensina II.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Report Geneva; 2009.
2. World Health Organization (WHO). Obesity and overweight [Internet]. Fact sheet N°311, 2014.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigitel Brasil 2013: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde; 2014
4. Kolotkin RL, Crosby RD, Kosloski KD, Williams GR. Development of a brief measure to assess quality of life in obesity. *Obesity Research & Clinical Practice*. 2001, 11:102–111.
5. World Health Organization (WHO). Obesity and Overweight. (Media centre, fact sheet N° 311) updated March, 2013.
6. World Health Organization. World Health Statistics 2012: Part III, Global healthIndicator, 2012.
7. Lerner ZF, Board WJ, Browning RC. Effects of Obesity on Lower Extremity Muscle Function During Walking at Two Speeds. *Gait Posture*. 2014, 39(3): 978–984.
8. Capodaglio P, Castelnuovo G, Brunani A, Vismara L, Villa V, Capodaglio M. Functional limitations and occupational issues in obesity: a review. *International Journal of Occupational Safety and Ergonomics*. 2010, 16: 507–523.
9. Maffiuletti NA, Jubeau M, Munzinger U, Bizzini M, Agosti F, De Col A, Lafortuna CL, Sartorio A. Differences in quadriceps muscle strength and fatigue between lean and obese subjects. *European Journal of Applied Physiology*. 2007, 101(1):51-9.

10. Anandacoomarasamy A, Fransen M, March L. Obesity and the musculoskeletal system. *Current Opinion in Rheumatology*. 2009, 21: 71–77.
11. Leone N, Courbon D, Berr C, Barberger-Gateau P, Tzourio C, et al.. Abdominal Obesity and Late-Onset Asthma: Cross-Sectional and Longitudinal Results: The 3C Study. *Obesity (Silver Spring)*, 2011.
12. Jebb SA, Moore MS. Contribution of a sedentary lifestyle and inactivity to the etiology of overweight and obesity: current evidence and research issues. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 1999, 31: S534–541.
13. Goodpaster BH, Theriault R, Watkins SC, Kelley DE. Intramuscular lipid content is increased in obesity and decreased by weight loss. *Metabolism*. 2000, 49(4):467-72.
14. Malenfant P, Tremblay A, Doucet E, Imbeault P, Simoneau JA, Joanisse DR. Elevated intramyocellular lipid concentration in obese subjects is not reduced after diet and exercise training. *The American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*; 2001, 280(4): 632-639.
15. Couturier A, Ringseis R, Mooren FC, Krüger K, Most E and Eder K. Carnitine supplementation to obese Zucker rats prevents obesity-induced type II to type I muscle fiber transition and favors an oxidative phenotype of skeletal muscle. *Nutrition & Metabolism*. 2013, 10: 1-11.
16. Fujita N, Nagatomo F, Murakami S, Kondo H, Ishihara A, and Fujino H. Effects of Hyperbaric Oxygen on Metabolic Capacity of the Skeletal Muscle in Type 2 Diabetic Rats with Obesity. *The Scientific World Journal*. 2012, 2012: 1-9.
17. Sishi B, Loos B, Ellis B, Smith W, du Toit EF, Engelbrecht AM. Diet-induced obesity alters signalling pathways and induces atrophy and apoptosis in skeletal muscle in a prediabetic rat model. *Experimental Physiology*. 2011, 96(2):179-193.

18. Mizunoya W, Iwamoto Y, Shirouchi B, Sato M, Komiya Y, Razin FR, Tatsumi R, Sato Y, Nakamura M, Ikeuchi Y. Dietary Fat Influences the Expression of Contractile and Metabolic Genes in Rat Skeletal Muscle. *PLoS ONE*. 2013, 8(11):1-14.
19. Johnston AP, Baker J, De Lisio M, Parise G. Skeletal muscle myoblasts possess a stretch-responsive local angiotensin signalling system. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 2011, 5:75–84.
20. Yoshida T, Tabony AM, Galvez S, Mitch WE, Higashi Y, Sukhanov S, Delafontaine P. Molecular mechanisms and signaling pathways of angiotensin II-induced muscle wasting: Potential therapeutic targets for cardiac cachexia. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2013, 45:2322–2332.
21. Frantz EDC, Crespo-Mascarenhas C, Barreto-Vianna ARC, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Renin-angiotensin system blockers protect pancreatic islets against diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *PLoS ONE*. 2013, 8:1-15.
22. Rezk BM, Yoshida T, Semprun-Prieto L, Higashi Y, Sukhanov S, Delafontaine P. Angiotensin II Infusion Induces Marked Diaphragmatic Skeletal Muscle Atrophy. *PLoS ONE*. 2012, 7: 1-7.
23. Yoshida T, Galvez S, Tiwari S, Rezk BM, Semprun-Prieto L, Higashi Y, Sukhanov S, Yablonka-Reuveni Z, Delafontaine P. Angiotensin II inhibits satellite cell proliferation and prevents skeletal muscle regeneration. *Journal of Biological Chemistry*. 2013, 288:23823-32.
24. Morales MG, Vazquez Y, Acuna MJ, Rivera JC, Simon F, et al. (2012) Angiotensin II-induced pro-fibrotic effects require p38MAPK activity and transforming growth factor beta 1 expression in skeletal muscle cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2012, 44: 1993–2002.

25. Bao W, Behm DJ, Nerurkar SS, Ao Z, Bentley R, Mirabile RC, Johns DG, Woods TN, Doe CP, Coatney RW, Ohlstein JF, Douglas SA, Willette RN, Yue TL. Effects of p38MAPK inhibitor on angiotensin II-dependent hypertension, organ damage, and superoxide anion production. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2007, 11:362–368.
26. Elbaz M, Yanay N, Aga-Mizrachi S, Brunschwig Z, Kassis I, Ettinger K, Barak V, Nevo Y. Losartan, a therapeutic candidate in congenital muscular dystrophy: studies in the dy2J/dy2J mouse. *Annals of Neurology Journal*. 2012, 71(5):699–708.
27. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological Reviews*. 2001, 81:807-869.
28. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews*. 2001, 22:153-183.
29. Frigolet ME, Torres N, Tovar AR. The renin-angiotensin system in adipose tissue and its metabolic consequences during obesity. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2013; 24(12):2003-15.
30. Boutagy NE, Marinik EL, McMillan RP, Anderson AS, Frisard MI, Davy BM, Rivero JM, Davy KP, Hulver MW. Angiotensin II receptor blockade and skeletal muscle metabolism in overweight and obese adults with elevated blood pressure. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*. 2015,1–6.
31. Takada S, Kinugawa S, Hirabayashi K, Suga T, Yokota T, Takahashi M, Fukushima A, Homma T, Ono T, Sobirin MA, Masaki Y, Mizushima W, Kadoguchi T, Okita K, Tsutsui H. Angiotensin II receptor blocker improves the lowered exercise capacity and impaired mitochondrial function of the skeletal muscle in type 2 diabetic mice. *Journal of Applied Physiology*. 2013, 114: 844–857.

32. Tam CS, Poder JE, Markovic TP, Yee C, Morsch M, Twigg SM. The effects of high-fat diet on physical function and skeletal muscle extracellular matrix. *Nutrition and Diabetes*. 2015, 5:1-4.
33. Hulens M, Vansant G, Lysens R, Claessens AL, Muls E. Exercise capacity in lean versus obese women. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*. 2001, 11: 305–309.
34. Przybyłowski T, Bielicki P, Kumor M, Hildebrand K, Maskey-Warzechowska M, Korczyński P, et al. Exercise capacity in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Journal of physiology and pharmacology*. 2007, 58 Supp 5(Pt 2):563–74.
35. Mikesky AE, Meyer A, Thompson KL. Relationship between quadriceps strength and rate of loading during gait in women. *Journal of Orthopaedic Research*. 2000, 18:171–5.
36. Wessels B, Broek NMAVD, Ciapaite J, Houten SM, Wanders RJA, Nicolay K, Prompers JJ. Carnitine supplementation in high-fat diet-fed rats does not ameliorate lipid-induced skeletal muscle mitochondrial dysfunction in vivo. *The American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 2015, 309: E670–E678.
37. Marques-Lopes I, Marti A, Moreno-Aliag MJ, Martínez A. Aspectos genéticos da obesidade. *Revista de Nutrição*. 2004; 17(3): 327-338.
38. Lionetti L, Mollica MP, Sica R, Donizzetti I, Gifuni G, Pignalosa A, Cavaliere G, Putti R. Differential Effects of High-Fish Oil and High-Lard Diets on Cells and Cytokines Involved in the Inflammatory Process in Rat Insulin-Sensitive Tissues. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014, 15:3040-3063.
39. Bost F, Aouadi M, Caron L, Even P, Belmonte N, Prot M, Dani C, Hofman P, Pagès G, Pouyssegur J, Le Marchand-Brustel Y, Binétruy B. The extracellular signal-regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for in vitro and in vivo adipogenesis. *Diabetes*. 2005, 54(2):402-11.

40. Aouadi M, Binetruy B, Caron L, Le Marchand-Brustel Y, Bost F. Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice. *Biochimie* 88. 2006, 1091–1098.
41. Bays HE, González-Campoy JM, Bray GA, Kitabchi AE, Bergman DA, Schorr AB, Rodbard HW, Henry RR. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte visceral adiposity. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*. 2008, 6(3): 343-368.
42. Goossens GH. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiology & Behavior*. 2008; 94:206–218.
43. Adamczak M, Wiecek A. The adipose tissue as an endocrine organ. *Seminars in Nephrology*. 2013, 33(1):2–13.
44. Oliveira JS, Bressan J. El tejido adiposo como regulador de la inflamación y de la obesidad. *EFDeportes.com, Revista Digital*. 2010,15:150.
45. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004, 89(6):2548-56.
46. Keller SR, Davis AC, Clairmont KB. Mice deficient in the insulin-regulated membrane aminopeptidase show substantial decreases in glucose transporter GLUT4 levels but maintain normal glucose homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, 277: 17677–86.
47. Yasue S, Masuzaki H, Okada S, Ishii T, Kozuka C, Tanaka T, et al. Adipose tissuespecific regulation of angiotensinogen in obese humans and mice: impact of nutritional status and adipocyte hypertrophy. *American Journal of Hypertension*. 2010, 23:425–31.
48. Ngueyn A, Cat D, Touyz RM. A new look at the renin-angiotensin system-focusing on the vascular system. *Peptides*. 2011, 32: 2141-2150.

49. Li L, Yi-Ming W, Li ZZ, Zhao L, Yu YS, Li DJ, Xia CY, Liu JG, Su DF. Local RAS and inflammatory factors are involved in cardiovascular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacological Research*. 2008, 58(3-4):196-201.
50. Campbell DJ, Habener JF. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *Journal of Clinical Investigation*. 1986, 78(1):31-9.
51. Levy BI. How to explain the differences between renin angiotensin system modulators. *American Journal of Hypertension*. 2005, 18(9):134S-41S.
52. Sukhanov S, Semprun-Prieto L, Yoshida T, Michael Tabony A, Higashi Y, Galvez S, Delafontaine P. Angiotensin II, oxidative stress and skeletal muscle wasting. *American Journal of the Medical Sciences*. 2011, 342(2):143-7.
53. Cabello-Verrugio C, Cordova G, Salas JD. Angiotensin II: Role in skeletal muscle atrophy. *Current Protein and Peptide Science Journal*. 2012, 13(6):560–569.
54. Semprun-Prieto LC, Sukhanov S, Yoshida T, Rezk BM, Gonzalez-Villalobos RA, Vaughn C, Michael Tabony A, Delafontaine P. Angiotensin II induced catabolic effect and muscle atrophy are redox dependent. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011, 409(2):217-21.
55. van Hees HW, van der Heijden HF, Ottenheijm CA, Heunks LM, Pigmans CJ, Verheugt FW, Brouwer RM, Dekhuijzen PN. Diaphragm single-fiber weakness and loss of myosin in congestive heart failure rats. *The American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2007, 293(1):H819–H828.
56. Strassburg S, Springer J, Anker SD. Muscle wasting in cardiac cachexia. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2005, 37(10):1938–1947.

57. Zhang L, Wang XH, Wang H, Du J, Mitch WE. Satellite cell dysfunction and impaired IGF-1 signaling cause CKD-induced muscle atrophy. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2010, 21(3):419–427.
58. Cabello-Verrugio 1, Morales MG, Rivera JC, Cabrera D, Simon F. Renin-angiotensin system: an old player with novel functions in skeletal muscle. *Medicinal Research Reviews*. 2015, 35(3):437-63.
59. Dalla-Libera L, Ravara B, Angelini A, Rossini K, Sandri M, Thiene G, Battista Ambrosio G, Vescovo G. Beneficial effects on skeletal muscle of the angiotensin II type 1 receptor blocker irbesartan in experimental heart failure. *Circulation*. 2001, 103(17):2195-200.
60. Russell ST, Eley H, Tisdale MJ. Role of reactive oxygen species in protein degradation in murine myotubes induced by proteolysis-inducing factor and angiotensin II. *Cellular Signalling*. 2007, 19(8):1797-806.
61. Zhang L, Du J, Hu Z, Han G, Delafontaine P, Garcia G, Mitch WE. IL-6 and serum amyloid A synergy mediates angiotensin II-induced muscle wasting. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2009, 20(3):604-12.
62. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades/REVIEW. *Nature*. 2001, 410(6824):37-40.
63. Boer RA, Pokharel S, Flesch M, van Kampen DA, Suurmeijer AJ, Boomsma F, et al. Extracellular signal regulated kinase and SMAD signaling both mediate the angiotensin II driven progression towards overt heart failure in homozygous TGR(mRen2)27. *Journal of Molecular Medicine (Berlin)*. 2004, 82:678–87.
64. Kiribayashi K, Masaki T, Naito T, Ogawa T, Ito T, Yorioka N, et al. Angiotensin II induces fibronectin expression in human peritoneal mesothelial cells via ERK1/2 and p38MAPK. *Kidney International*. 2005, 67:1126–35.

65. Stefanovsky V, Langlois F, Gagnon-Kugler T, Rothblum LI, Moss T. Growth factor signaling regulates elongation of RNA polymerase I transcription in mammals via UBF phosphorylation and r-chromatin remodeling. *Molecular Cell*. 2006, 21(5):629-39.
66. Haddad F, Adams GR. Inhibition of MAP/ERK kinase prevents IGF-I-induced hypertrophy in rat muscles. *Journal of Applied Physiology* (1985). 2004, 96(1):203-10.
67. Shi H, Scheffler JM, Zeng C, Pleitner JM, Hannon KM, Grant AL. Mitogen-activated protein kinase signaling is necessary for the maintenance of skeletal muscle mass. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2009, 296:C1040-C1048.
68. Bogoyevitch MA. The isoform-specific functions of the c-Jun N-terminal Kinases (JNKs): differences revealed by gene targeting. *Bioessays*. 2006, 28(9):923-34.
69. Shi H, Scheffler JM, Pleitner JM, Zeng C, Park S, Hannon KM, Grant AL, Gerrard DE. Modulation of skeletal muscle fiber type by mitogen-activated protein kinase signaling. *FASEB Journal*. 2008, 22: 2990–3000.
70. Cabello-Verrugio C, Acuña MJ, Morales MG, Becerra A, Simon F, Brandan E. Fibrotic response induced by angiotensin-II requires NAD(P)H oxidase-induced reactive oxygen species (ROS) in skeletal muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011, 410:665–670.
71. Lakshmanan AP, Watanabe K, Thandavarayan RA, et al. Telmisartan attenuates oxidative stress and renal fibrosis in streptozotocin induced diabetic mice with the alteration of angiotensin-(1-7) mas receptor expression associated with its PPAR-gamma agonist action. *Free Radical Research*. 2011, 45:575–584.
72. Morales MG, Abrigo J, Meneses C, Simon F, Cisternas F, Rivera JC, Vazquez Y, Cabello-Verrugio C. The Ang-(1–7)/Mas-1 axis attenuates the expression and

signalling of TGF-beta1 induced by AngII in mouse skeletal muscle. *Clinical Science Journal*. 2014, 127(4):251–264.

73. Schmidt B, Schieffer B. Angiotensin II AT1 receptor antagonists. Clinical implications of active metabolites. *Journal of Medical Biochemistry*. 2003, 46(12):2261-70.

74. Gonçalves G, Zornoff LAM, Ribeiro HB, Okoshi MP, Cordaro FRS, Okoshi K, Padovani CR, Aragon FF, Cicogna AC. O Bloqueio do Sistema Renina-Angiotensina Atenua a Remodelação Cardíaca de Ratos Submetidos a Estenose Aórtica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2005, 84 (4):304-308.

75. Oliveira-Junior SA, Martinez PF, Guizoni DM, Campos DH, Fernandes T, Oliveira EM, Okoshi MP, Okoshi K, Padovani CR, Cicogna AC. AT1 receptor blockade attenuates insulin resistance and myocardial remodeling in rats with diet-induced obesity. *PLoS One*. 2014, 9(1):e86447.

76. Committee on Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the care and use of laboratory animals. Bethesda: National Institute of Health; 1985.

77. Martins F, Campos DHS, Pagan LU, Martinez PF, Okoshi K, Okoshi MP, Padovani CR, Souza AS, Cicogna AC, Oliveira-Junior SA. High-fat Diet Promotes Cardiac Remodeling in an Experimental Model of Obesity. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2015, 105 (5):479-486.

78. Campos, Dijon Henrique Salomé. Influência da dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados sobre o metabolismo, estrutura e função cardíaca de ratos com estenose aórtica supravalvar. Botucatu, 2014. 80p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista.

79. Oliveira JR, Silvio Assis de. Influência do bloqueio de receptores do tipo 1 (at1)sobre o perfil metabólico, endócrino e cardiovascular de ratos obesos. Botucatu, 2011. 126p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista.

80. Motta VT. Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações. 4 ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau. 2003, 10:121-142.
81. Dubowitz V. Muscle Biopsy: a Practical Approach. 2nd ed. London: Bailliere Tindall; 1985.
82. Damatto RL, Martinez PF, Lima ARR, Cezar MDM, Campos DHS, Oliveira Junior SA, Guizoni DM, Bonomo C, Nakatani BT, Dal Pai Silva M, Carvalho RF, Okoshi K, Okoshi MP. Heart failure-induced skeletal myopathy in spontaneously hypertensive rats. *International Journal of Cardiology*. 2013, 167 (2013):698–703.
83. Gomes MJ, Martinez PF, Campos DHS, Pagan LU, Bonomo C, Lima ARR, Damatto RL, Cezar MDM, Damatto FC, Rosa CM, Garcia CM, Reis DRA, Fernandes AAH, Fernandes DC, Laurindo FR, Okoshi K, Okoshi MP. Beneficial effects of physical exercise on functional capacity and skeletal muscle oxidative stress in rats with aortic stenosis-induced heart failure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016, 8695716: 1-12.
84. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976, 72:248-254.
85. Pincu Y, Linden MA, Zou K, Baynard T, Boppart MD. The effects of high fat diet and moderate exercise on TGFb1 and collagen deposition in mouse skeletal muscle. *Cytokine*. 2015, 73: 23–29.
86. Seo S, Lee MS, Chang E, Shin Y, Oh S, Kim IH, Kim Y. Rutin Increases Muscle Mitochondrial Biogenesis with AMPK Activation in High-Fat Diet-Induced Obese Rats. *Nutrients*. 2015, 7: 8152-8169.
87. Trayhurn P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiologica Scandinavica Journal*. 2005, 184(4):285–293.

88. Rosselli M, Burgueno A, Carabelli J, Schuman M, Pirola C, et al. Losartan reduces liver expression of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) in a high fat-induced rat nonalcoholic fatty liver disease model. *Atherosclerosis*. 2009, 206(1):119–126.
89. Müller-Fielitz H, Lau M, Geißler C, Werner L, Winkler M, Raasch W. Preventing leptin resistance by blocking angiotensin II AT1 receptors in diet-induced obese rats. *British Journal of Pharmacology*. 2015, 172 857–868 857.
90. Izumiya Y, Hopkins T, Morris C, Sato K, Zeng L, Viereck J, Hamilton JA, Ouchi N, LeBrasseur NK, Walsh K. Fast/Glycolytic Muscle Fiber Growth Reduces Fat Mass and Improves Metabolic Parameters in Obese Mice. *Cell Metabolism*. 2008, 7(2): 159–172.
91. Cheng KK, Akasaki Y, Lecommandeur E, Lindsay RT, Murfitt S, Walsh K, Griffin JL. Metabolomic Analysis of Akt1-Mediated Muscle Hypertrophy in Models of Diet-Induced Obesity and Age-Related Fat Accumulation. *Journal of Proteome Research*. 2015, 14: 342–352.
92. Roth RJ, Le AM, Zhang L, Kahn M, Samuel VT, Shulman GI, Bennett AM. MAPK phosphatase-1 facilitates the loss of oxidative myofibers associated with obesity in mice. *Journal of Clinical Investigation*. 2009, 119:3817–3829.
93. Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37. 2005, 1974–1984.
94. Gupte AA, Bomhoff GL, Morris JK, Gorres BK, Geiger PC. Lipoic acid increases heat shock protein expression and inhibits stress kinase activation to improve insulin signaling in skeletal muscle from high-fat-fed rats. *Journal of Applied Physiology*. 2009, 106: 1425–1434.
95. Zick Y. Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance. *Science Signalling STKE*. 2005, 4.

96. Murphy AM, Wong AL, Bezuhly M. Modulation of angiotensin II signaling in the prevention of fibrosis. *Fibrogenesis & Tissue Repair*. 2015, 8 (7): 1-7.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA





Comissão de Ética no Uso de Animais
Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012

CERTIFICADO Nº 1105/2014-CEUA

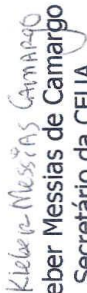
CERTIFICAMOS que o Projeto de Pesquisa (**Protocolo CEUA 1105/2014**) **Participação da angiotensina II na modulação do fenótipo da musculatura esquelética em ratos obesos**, a ser conduzido por Nayara de Araujo Muzili, orientada pela Profa. Dra. Paula Felipe Martinez, co-orientada por Silvio Assis de Oliveira Júnior, com a colaboração de Antônio Carlos Cicogna, Katashi Okoshi, Luana Urbano Pagan, Mariana Janini Gomes, Marina Politi Okoshi, Paula Grippa Sant'ana e Ricardo Luiz Damatto, está de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, com a ressalva de que os "ratos" são provenientes de Biotério Convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.

CERTIFICAMOS, ainda que foi autorizada a utilização de "48 ratos". Caso seja necessária a utilização de mais animais deverá ser comunicado a esta CEUA.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 30/10/2014



Profa. Adjunto Noeme Sousa Rocha
Vice-Presidente da CEUA



Kleber Messias de Camargo
Secretário da CEUA

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone: (14) 3880-1608/3880-1609 e-mail secretaria: kleber@fmb.unesp.br



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFMS



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 637/2014 da Pesquisadora **Paula Felipe Martinez**, referente ao projeto de pesquisa “Participação da angiotensina II na modulação do fenótipo da musculatura esquelética em ratos obesos”, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião ordinária do dia 15 de dezembro de 2014.

Maria Araújo Teixeira
Coordenadora da CEUA/UFMS

Campo Grande, 15 de dezembro de 2014.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua.2000@gmail.com
fone (67) 3345-7186