Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Thiago da Silva Torres

Fenofibrato (agonista do receptor ativador da proliferação peroxissomal) modula o sistema renina-angiotensina no coração de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica

Rio de Janeiro
2012

Thiago da Silva Torres

Fenofibrato (agonista do receptor ativador da proliferação peroxissomal) modula o sistema renina-angiotensina no coração de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador : Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda

Coorientadora: Prof.ª Dra. Márcia Barbosa Águila

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

T693 Torres, Thiago da Silva.

Fenofibrato (agonista do receptor ativador da proliferação peroxissomal) modula o sistema renina-angiotensina no coração de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica / Thiago da Silva Torres. – 2012.
94 f.

Orientador: Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda.
Coorientadora: Márcia Barbosa Águila.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Fenofibrato. 2. Receptores ativados por proliferador de peroxissomos - Agonistas. 3. Proliferadores de peroxissomos. 4. Sistema renina-angiotensina- Teses. 5. PPAR-alfa – Agonistas. 6. Camundongos – Teses. I. Mandarim-de-Lacerda, Carlos Alberto. II. Águila, Márcia Barbosa. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

_____ _____

Assinatura Data

Thiago da Silva Torres

Fenofibrato (agonista do receptor ativador da proliferação peroxissomal) modula o sistema renina-angiotensina no coração de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor , ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 13 de março de 2012.

Banca Examinadora:

_____
Prof. Dr. Carlos Mandarim-de-Lacerda
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____
Profª. Dra. Angela de Castro Resende
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____
Prof. Dr. Antonio Felipe Sanjuliani
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

_____
Prof. Dr. Márcio Antônio Babinski
Universidade Federal Fluminense - UFF

_____
Prof. Dr. Célio Fernando de Sousa Rodrigues
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

Rio de Janeiro

2012

DEDICATÓRIA

À minha filha, Maria Letícia, minha família, amigos e aos meus orientadores.

AGRADECIMENTOS

À minha família, que sempre apoiou e acreditou no meu trabalho. Em particular minha mãe, cujo incentivo vem de muito cedo, desde o início da minha fase escolar, e que hoje, depois de muitos anos, resulta na minha formação como pós-graduando. Em especial à minha filha Maria Letícia, que tão pequena e nova no mundo, desperta e ensina tantas coisas. Também à Lícia, que além de ter acompanhado todo meu empenho, me deu tão grande presente.

Aos meus orientadores, Prof. Mandarim e Profª Márcia, pela chance de trabalhar em um ambiente tão rico de conhecimentos. Aprendi e desenvolvi muito como profissional e como pessoa e devo isso às oportunidades e aos exemplos que tive dos meus dedicados orientadores. Foi muito importante ter sido orientado por vocês.

Aos amigos Rodrigo e Vinícius, pela amizade e incentivo dedicados. O apoio de vocês marcou essa minha etapa de vida. À Sandra pela amizade de sempre e pela contribuição neste trabalho, dedicando seu esforço para ajudar nas horas precisa.

A todos os amigos do LMMC. Aos que por aqui já passaram, lembro sempre e agradeço muito pelos ensinamentos e apoio numa fase importante, a do início, da descoberta, e aos novos, que renovam nossos conceitos e aprendizados. Em especial ao Leonardo Mendonça, Caroline Fernandes e Alessandra Pinheiro, pelas técnicas ensinadas, ajuda na bancada, opiniões e sugestões sempre criteriosas; às amigas Bianca Gregório e Vanessa Mello, pela ajuda da equipe no sacrifício dos animais, como também por ter estado comigo desde o começo, incentivando e participando no meu trabalho; às amigas Fernanda Amorim, Mariana Catta-Preta, Alini Schultz, Eliete Frantz, Isabele Bringhenti e Ana Volpato e aos amigos Milton Costa e António Ludgero, cujas conversas, discussões, sugestões e reflexões serviram de ideias e contribuíram de forma direta para o desenvolvimento deste trabalho. Compartilhamos muitos momentos de vida e isso estará para sempre registrado.

Aos alunos de iniciação científica Rebeca Diamantino, Bruno Verly, Lidiane Araújo, Jéssica Lopes e Michele Cunha, pela contribuição importante para a realização deste trabalho. A dedicação de vocês foi fundamental para o manejo dos animais no biotério, sacrifício, processamento, trabalhos de bancada e análise dos dados.

Às técnicas Thatiany Marinho, Angélica Beatriz e Aline Carvalho, sempre prontas para ajudar com meu material e com os trabalhos de bancada. A ajuda de vocês tornou meu

trabalho melhor. Aos técnicos da anatomia Wilian Lannes, Luís Carlos Lannes e Atos, pelo trabalho dedicado na minha passagem como professor ATRAN da UERJ.

Aos professores e técnicos do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – ICBS (antigo CCBi). Grande parte da minha formação como "pessoa profissional" deve-se a vocês. Em especial Célio Fernando, cujo incentivo deu início a toda minha formação como pós-graduando. Também aos amigos Bernardo Lucena, Fernando Camelo e Jacqueline Brito. Carrego seus ensinamentos desde o começo da minha graduação.

Aos amigos Albino Fonseca e Geraldo de Oliveira (este também comigo na UERJ), professores da Universidade Federal Fluminense – UFF. Este foi um ano importante de encontro e início de carreira que me influenciou como profissional e aluno de doutorado.

O homem é uma corda estendida entre o animal e o Além-Homem: uma corda sobre o abismo. Perigoso passar um abismo, perigoso seguir esse caminho, perigoso olhar para trás, perigoso temer e parar. A grandeza do homem consiste em ser uma ponte e não uma meta

Friedrich Nietzsche

RESUMO

TORRES, Thiago S. *Fenofibrato (agonista do receptor ativador da proliferação peroxissomal) modula o sistema renina-angiotensina no coração de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica*. 2012. 94f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

O objetivo deste trabalho foi estudar a ação do fenofibrato, um agonista do receptor ativador da proliferação peroxissomal alfa, no remodelamento cardíaco e na expressão de componentes do sistema renina-angiotensina (SRA) em um modelo de obesidade induzida por dieta. Camundongos machos C57Bl/6 com três meses de idade foram alimentados durante 11 semanas com dieta controle (grupo C, 3,57 kcal/g de dieta) ou dieta hiperlipídica (grupo HL, 5,40 kcal/g de dieta), em seguida foram separados em quatro grupos e estudados durante cinco semanas: C; HL; C-L (C mais fenofibrato) e HL-F (HL mais fenofibrato). Os animais HL foram mais pesados e apresentaram maior pressão arterial (PA) comparados aos animais C, mas HL-F foram mais leves e tiveram PA menor que HL. A resistência insulínica vista nos camundongos HL foi melhorada com fenofibrato nos camundongos HL-F. Fenofibrato reduziu colesterol total, triglicerídeos e aumentou HDL-c. Os animais HL apresentou um ventrículo esquerdo (VE) mais pesado e com espessura da parede maior, como também cardiomiócitos maiores e uma menor razão cardiomiócito/capilares que os animais C. Fenofibrato foi eficiente em melhorar estas alterações. As expressões cardíacas de Angiotensina II (ANG II) e de seu receptor tipo 1 (AT1R) foram maiores, enquanto que a expressão de seu receptor tipo 2 (AT2R) foi menor nos animais HL que nos animais C, e fenofibrato foi eficiente em atenuar estas diferenças. Como conclusão, a dieta HL lidera para a obesidade, elevação da PA, hipertrofia cardíaca, alterações metabólicas e expressão proteica alterada do SRA em camundongos, sugerindo a participação do SRA nestas alterações. Fenofibrato é eficiente em diminuir a PA e controlar a expressão proteica do SRA, assim como no tratamento da resistência insulínica e do remodelamento cardíaco adverso, diminuindo a hipertrofia dos cardiomiócitos e melhorando a vascularização do miocárdio, desta maneira, diminuindo importantes fatores de risco para doenças cardiovasculares.

Palavras-chave: Sistema Renina-Angiotensina. Agonista PPAR-alfa. Remodelamento Cardíaco. Vascularização Miocárdica. Camundongos C57Bl/6.

ABSTRACT

The aim was to study the action of fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist, in cardiac remodeling and protein expressions of RAS components in a model of obesity induced by diet. 3-mo-old C57BL/6 male were fed for 11 weeks with standard chow (SC group, 3.57 kcal/g of chow) or high-fat chow (HF group, 5.40 kcal/g of chow), then they were separated into four groups and studied for five weeks: SC; HF; SC-F (SC plus fenofibrate) and HF-F (HF plus fenofibrate). HF was heavier and had higher blood pressure (BP) than SC, but HF-F was lighter and had lower BP than HF. The insulin resistance seen in HF mice was corrected by fenofibrate in HF-F mice. Fenofibrate reduced total cholesterol, triglycerides and raised the HDL-c. HF had thicker and heavier left ventricle (LV) with bigger LV cardiomyocyte and smaller cardiomyocyte-to-capillaries ratio than SC, and fenofibrate was efficient in treating these alterations. Cardiac expressions of angiotensin II (ANG II) and ANG II receptor 1 were higher, and ANG II receptor 2 was lower in HF than in SC, and fenofibrate was efficient in attenuating these differences. In conclusion, HF diet leads to obesity, BP elevation, cardiac hypertrophy, metabolic changes and altered RAS protein expression in mice, suggesting that RAS is involved. Fenofibrate is efficient in decreasing BP and in controlling RAS protein expressions, and treats the insulin resistance and the adverse cardiac remodeling decreasing the cardiomyocyte hypertrophy and improving the myocardial vascularization, therefore, decreasing important cardiovascular risk factors.

Keywords: Renin-Angiotensin System. PPAR-Alpha Agonist. Cardiac Remodeling. Myocardial Vascularization. C57Bl/6 Mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fisiopatologia da síndrome metabólica..... 21

Figura 2 – Sistema renina-angiotensina..... 24

Figura 3 – Tecido adiposo na resistência insulínica..... 31

Figura 4 – Resumo da função biológica da insulina..... 32

Figura 5 – Rotas de sinalização da insulina..... 35

Figura 6 – Esteatose hepática e resistência insulínica..... 37

Figura 7 – Ativação do PPAR e transcrição gênica..... 40

Figura 8 – Estereologia do ventrículo esquerdo..... 49

Figura 9 – Morfometria do adipócito..... 51

Figura 10 – Evolução da massa corporal..... 54

Figura 11 – Pressão arterial sistólica..... 55

Figura 12 – Curva do teste oral de tolerância à glicose (TOTG)..... 57

Figura 13 – Curva do teste intraperitoneal de tolerância à insulina (TITI)..... 57

Figura 14 – Cortes transversais do ventrículo esquerdo ao nível dos músculos papilares para medir a espessura ventricular..... 60

Figura 15 – Área seccional média do cardiomiócito..... 61

Figura 16 – Razão entre a densidade de volume dos capilares intramiocárdicos e o cardiomiócito..... 62

Figura 17 – Fotomicrografias do miocárdio (corado com picro Sirius red em todos os grupos) em todos os grupos mostrando cardiomiócitos e capilares..... 63

Figura 18 – *Western blotting* da expressão de Angiotensina II no ventrículo esquerdo corrigido por beta-actina..... 65

Figura 19 – *Western blotting* da expressão do receptor tipo 1 da Angiotensina II no ventrículo esquerdo corrigido por beta-actina..... 66

Figura 20 – *Western blotting* da expressão do receptor tipo 2 da Angiotensina II no ventrículo esquerdo corrigido por beta-actina..... 67

Figura 21 – Diâmetro dos adipócitos no tecido adiposo apididimário..... 68

Figura 22 – Esteatose hepática..... 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Definições para o diagnóstico da síndrome metabólica no homem..... 19

Tabela 2 – Composição das dietas controle (C) e hiperlipídica (HL)..... 45

Tabela 3 – Consumo alimentar e energético, metabolismo de carboidratos e lipídios, biometria da gordura epididimária, fígado, e ventrículo esquerdo..... 59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS NO TEXTO

A –	Área Seccional Média
ACC –	Acetil-CoA Carboxilase
AGL –	Ácidos Graxos Livres
AIN –	Instituição Americana de Nutrição (*American Institute of Nutrition*)
Akt –	Proteína Quinase B
ANG –	Angiotensina
AP-1 –	Proteína ativadora-1
AMPK/MEK –	Proteína Quinase Ativadora da Adenosina Monofosfato
Apo –	Apolipoproteína
ASC –	Área sob a Curva
A_T –	Área Teste
AT1R –	Receptor do Tipo 1 de Angiotensina II
ATR2R –	Receptor do Tipo 2 de Angiotensina II
ATP –	Adenosita Trifosfato
Cap –	Capilares Intramiocárdicos
Cmi –	Cardiomiócitos
COX-2 –	Ciclooxigenase – 2
CPT-1 –	Carnitina Palmitoilaciltransferase - 1
CT –	Colesterol Total
CYP4A –	Citocromo P450 4A
DOCA –	Deoxicorticosterona
ECA –	Enzima Conversora da Angiotensina
FACoA –	Acil-CoA Gordurosa
FAS –	Ácido Graxo Sintetase
GLUT –	Transportador de Glicose
Grupo C –	Grupo Controle
Grupo C-F –	Grupo com dieta controle e tratado com fenofibrato
Grupo HL –	Grupo com dieta hiperlipídica
Grupo HL-F –	Grupo com dieta hiperlipídica e tratado com fenofibrato
HDL –	Lipoproteína de Alta Densidade
HMG-CoAR –	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase
I/G –	Razão Insulina:Glicose
ICAM-1 –	Meolécula de Adesão Intercelular-1

IL-6 –	Interleucina-6
JNK –	Proteína Quinase c-Jun-NH2-Terminal
LDL –	Lipoproteína de Baixa Densidade
LHS –	Lipase Hormônio-Sensitiva
LMS –	Lipase Hormônio Sensitivs
LPL –	Lipoproteína Lipase
LTGA –	Lipase de Triglicerídeo Adiposo
MAPK –	Proteína Quinase Ativadora Mitogênica
Mas –	Receptor da Angiotensina-(1-7)
MCP-1 –	Proteína Quimioatraente de Monócito - 1
NADPH –	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NAFDL –	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
NASH –	Esteatohepatite Não Alcoólica
NF-kB –	Fator Nuclear Kappa B
ON –	Óxido Nítrico
PAI-1 –	Inibidor do Ativador de Plasminogênio-1
PECAM –	Molécula de Adesão Celular Endotelial Plaquetário
PI-3 –	Quinase Fosfatidilinositol-3
PKA –	Proteína Quinase A
PPAR –	Receptor Ativador de Proliferação Peroxissomal
PPRE –	Elementos Resposta PPAR
PTCE –	Proteína de Transferência Colesteril-Éster
RXR –	Retinóide X para o Ácido 9-*Cis*-Retinóico
SM –	Síndrome Metabólica
SRA –	Sistema Renina-Angiotensina
SREBP-1c –	Proteína de Ligação ao Elemento Regulador do Esterol - 1c
SRI –	Substrato do Receptor de Insulina
TG –	Triglicérides
TGF –	Fator de Crescimento de Transformação Beta
TITI –	Teste Intraperitoneal de Tolerância à Insulina
TNF –	Fator de Necrose Tumoral
TOTG –	Teste Oral de Tolerância à Glicose
VCAM-1 –	Molécula de Adesão Celular Vascular-1
VLDL –	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
Vv –	Densidade de Volume

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	**OBJETIVOS**	16
1.1	**Objetivo geral**	16
1.2	**Objetivos específicos**	16
2	**REVISÃO DE LITERATURA**	17
2.1	**Síndrome metabólica e modelos experimentais**	17
2.1.1	Síndrome metabólica	17
2.1.2	Modelos experimentais	22
2.2	**Sistema renina-angiotensina e o controle da pressão arterial**	23
2.2.1	sistema renina-angiotensina e angiotensina II	23
2.2.2	Receptor tipo 1 de angiotensina	25
2.2.3	Receptor tipo 2 de angiotensina	26
2.2.4	Sistema renina-angiotensina cardíaco local	26
2.2.5	Hipertensão arterial, obesidade, resistência insulínica e SRA	27
2.3	**Tecido adiposo**	28
2.4	**Fígado e resistência insulínica**	30
2.4.1	Resistência insulínica	30
2.4.2	Alterações hepáticas	35
2.5	**Receptores ativadores da proliferação peroxissomal**	38
2.5.1	PPARs	38
2.5.2	Fenofibrato, um agonista PPAR-alfa	40
3	**MATERIAL E MÉTODOS**	43
3.1	**Animais e tratamento**	43
3.2	**Massa corporal e ingestão energética**	44
3.3	**Pressão arterial**	44
3.4	**Metabolismo de carboidratos**	46
3.4.1	Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)	46
3.4.2	Teste intraperitoneal de tolerância à insulina (TITI)	46
3.5	**Eutanásia**	47
3.6	**Metabolismo de lipídios – análises bioquímicas**	47
3.7	**Análise Milliplex**	48
3.8	**Estereologia do miocárdio**	48
3.9	***Western blotting* para ANG II, AT1R e AT2R**	49
3.10	**Morfologia do adipócito**	50
3.11	**Esteatose hepática**	51

3.12 **Análise dos dados**..... 52
4 **RESULTADOS**..... 53
4.1 **Ingestão alimentar e de energia, massa corporal, e pressão arterial**..... 53
4.2 **Metabolismo de carboidratos**..... 56
4.3 **Metabolismo de lipídios**..... 58
4.4 **Ventrículo esquerdo**..... 58
4.5 ***Western blotting* para ANG II, AT1R, e AT2R**..... 64
4.6 **Morfometria do tecido adiposo**..... 64
4.7 **Esteatose hepática**..... 68
5 **DISCUSSÃO**..... 70
6 **CONCLUSÃO**..... 74
REFERÊNCIAS..... 75
APÊNDICE..... 92

INTRODUÇÃO

A obesidade é um problema comum em grande parte do mundo Ocidental e, sabe-se hoje, está associada com várias doenças, especialmente a hipertensão arterial (Aneja *et al.*, 2004) e a resistência à insulina (Aguila *et al.*, 2010). Vários mecanismos são ativados pela obesidade em animais e em humanos, incluindo resistência à insulina, esteatose hepática, inflamação, aumento da atividade do sistema renina-angiotensina (SRA), estresse oxidativo e desregulação autonômica (Alkhouri *et al.*, 2010; Sironi *et al.*, 2011). Obesidade, resistência à insulina, intolerância à glicose/diabetes tipo 2 e hipertensão arterial em conjunto são componentes da síndrome metabólica e são fatores de risco para doenças cardiovasculares (Sironi *et al.*, 2011). A hipertensão arterial é o problema de saúde mais comum relacionado à obesidade (Kurukulasuriya *et al.*, 2011) e leva ao aumento da massa do ventrículo esquerdo e da espessura das camadas média e íntima das grandes artérias, condições que aumentam a incidência de doenças cardiovasculares em adultos (Urbina *et al.*, 2011).

O SRA é um regulador essencial da homeostase fisiológica e tem um importante papel na fisiopatologia de doenças humanas, como a hipertensão arterial e doenças cardiovasculares. A angiotensina II (ANG II) é um octapeptídeo considerado o principal mediador do SRA. É um potente vasoconstritor e, assim, aumenta a pressão arterial (Esther *et al.*, 1997). Os efeitos fisiológicos da ANG II são mediados principalmente por seu receptor do tipo 1 (AT1R), presente na membrana plasmática, e, em menor parte, por seu receptor do tipo 2 (AT2R) (Mukoyama *et al.*, 1993). A ativação do AT1R estimula vasoconstrição, hipertrofia e hiperplasia das células vasculares, retensão de sódio, geração de espécies reativas de oxigênio via indução da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), e também induz processos inflamatórios, trombóticos e fibróticos (Iwai e Inagami, 1992). Independente de seus efeitos sobre a pressão arterial, a ANG II, via sua interação com o AT1R, contribui para o remodelamento do ventrículo esquerdo, para alterações na morfologia e propriedade mecânica vascular e para o desenvolvimento de disfunção endotelial. Em condições fisiológicas, o AT2R antagoniza as ações do AT1R inibindo o crescimento celular e induzindo a apoptose e a vasodilatação (Flynn e Tullus, 2009).

A distribuição de gordura corporal é considerada importante na gênese da síndrome da obesidade-hipertensão, sendo a distribuição central particularmente importante (Aneja *et al.*,

2004). Em humanos, a obesidade é considerada um fator patogênico independente no desenvolvimento de cardiomiopatias e insuficiência cardíaca (Kenchaiah *et al.*, 2002), com alterações estruturais significativas em cardiomiócitos e capilares, hipertrofia e disfunção do ventrículo esquerdo (Gruber *et al.*, 2011).

Ocorre elevação da pressão arterial em ratos obesos por dieta, pois o tecido adiposo também produz ANG II a partir da ativação local do SRA. A ingestão aumentada de lipídios na dieta modula a reatividade vascular em resposta a ANG II e as espécies reativas de oxigênio, assim como a expressão vascular de ANG II e de receptores de endotelina (Mundy *et al.*, 2007). Drogas bloqueadoras do SRA têm a habilidade de reverter o aumento da pressão arterial causado pela obesidade (Boustany *et al.*, 2005). Tembém o bloqueio do SRA reduz os níveis plasmáticos de insulina e leptina circulantes em ratos (Velkoska *et al.*, 2010), acarretando a perda de peso e melhorando a sensibilidade à insulina (Weisinger *et al.*, 2009). Provavelmente, pelo menos em parte, o bloqueio do SRA pode proteger a função da ilhota pancreática em ratos submetidos à dieta hiperlipídica via redução da regulação da inflamação, do estresse oxidativo, melhorando a função do retículo endoplasmático das células da ilhota pancreática (Yuan *et al.*, 2010).

O fenofibrato é um derivado do ácido fíbrico e um agente hipolipemiante clinicamente usado para diminuir o risco causado pela aterosclerose. O fenofibrato tem seus efeitos hipolipemiantes mediados via ativação da isoforma alfa do receptor ativador da proliferação peroxissomal (PPAR-alfa) (Balakumar *et al.*, 2011). O ativador do PPAR-alfa antagoniza as ações da ANG II *in vivo* e em *in vitro* e exerce efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios cardiovasculares. Também reduz a pressão arterial e corrige a estrutura vascular e a disfunção endotelial em muitos modelos de hipertensão arterial em roedores (Schiffrin, 2005), com a consequente diminuição da deposição de colágeno na parede arterial em ratos infundidos com ANG II (Diep *et al.*, 2004). Além disso, inibidores da enzima conversora de angiotensina restauram a resposta à insulina em corações de camundongos *ob/ob* e normaliza a atividade da proteína quinase ativadora da adenosina monofosfato (AMPK) independente de seus efeitos na homeostase metabólica sistêmica (Tabbi-Anneni *et al.*, 2008).

Apesar dessas evidências, ainda é controverso o papel do SRA na hipertensão arterial decorrente da obesidade induzida por dieta (Smith *et al.*, 2006). Sendo assim, o presente trabalho tem a seguinte proposta:

1. **OBJETIVOS**

1.1. **Objetivo geral**

Avaliar a ação do fenofibrato, um agonista PPAR-alfa, no remodelamento cardíaco e na expressão cardíaca de componentes do sistema renina-angiotensina em modelo animal de obesidade induzida por dieta.

1.2. **Objetivos específicos**

a. Induzir sobrepeso/obesidade por administração de dieta hiperlipídica em camundongos;
b. Avaliar as alterações no metabolismo de carboidratos nesses animais referentes à intolerância à glicose e resistência à insulina e verificar o efeito do tratamento farmacológico com fenofibrato sobre esses parâmetros;
c. Avaliar os efeitos do fenofibrato sobre o metabolismo de colesterol total, tiglicerídeos e lipoproteína de alta densidade, assim como seus efeitos sobre o tecido adiposo e esteatose hepática;
d. Avaliar os efeitos do fenofibrato sobre a pressão arterial e a expressão tecidual de componentes do sistema renina-angiotensina;
e. Avaliar os efeitos do fenofibrato sobre o remodelamento cardíaco adverso, principalmente a hipertrofia de cardiomiócitos e vascularização miocárdica.

2. **REVISÃO DE LITERATURA**

2.1. **Síndrome metabólica e modelos animais**

A síndrome metabólica (SM) está relacionada com alto risco de desenvolver doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2. Como compreende um grupo de diferentes fatores de risco, e com uma patogênese não tão bem entendida, várias definições se desenvolveram. A obesidade central e a resistência à insulina são conhecidas como importantes fatores causais (Anderson *et al.*, 2001; Nesto, 2003; Carr *et al.*, 2004) junto com outras condições associadas, incluindo inatividade física (Gustat *et al.*, 2002), envelhecimento (Ford *et al.*, 2002) e distúrbio hormonal, tal como a síndrome dos ovários policísticos ou insuficiência de testosterona(Apridonidze *et al.*, 2005; Saad e Gooren, 2009).

2.1.1. Síndrome metabólica

O conceito de grupo de fatores de risco foi primeiro descrito por Reaven em 1988 (Reaven, 1988). Os critérios da Organização Mundial da Saúde (Alberti e Zimmet, 1998) e do Grupo Europeu para o Estudo da Resistência Insulínica (Balkau e Charles, 1999), enfatizam a participação da resistência à insulina na SM. Todos concordam com os componentes centrais para o diagnóstico da SM: obesidade, resistência à insulina, dislipidemia e hipertensão arterial, mesmo que os valores sejam ligeiramente diferentes, quando os diferentes estudos são comparados (Tabela 1). Segundo o Programa Nacional de Educação do Colesterol - Terceiro Painel de Tratamento do Adulto, a SM representa uma combinação de pelo menos três componentes dos apresentados na Tabela 1, e devido a sua simplicidade e praticidade, ela é a definição recomendada pela I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica (---, 2004b).

Recentemente, uma série de outros fatores foi identificada, tais como: síndrome dos ovários policísticos, *acanthosis nigricans*, doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD da sigla em inglês *nonalcoholic fatty liver disease*), microalbuminúria, estados pró-trombóticos, próinflamatórios, disfunção endotelial e hiperuricemia (Bloomgarden, 2004).

Aproximadamente 40% dos adultos com mais de 60 anos nos Estados Unidos têm SM (Ford *et al.*, 2002; Ford *et al.*, 2010), assim como um a cada quatro adultos da população europeia tem SM (Martinez *et al.*, 2008), igualmente na América Latina (Escobedo *et al.*, 2009). No Brasil, um estudo recente revelou a prevalência da SM em 3,6% das crianças em idade escolar no Estado de São Paulo (Seki *et al.*, 2009). Até o presente momento não existem dados que permitam descrever precisamente a prevalência da SM na população adulta do Brasil.

Existem várias hipóteses propostas para o desenvolvimento da SM (Figura 1). Uma dessas hipóteses sugere que a disfunção do tecido adiposo é a causa primária, resultando em um metabolismo anormal de ácidos graxos livres (AGL) e liberação de adipocinas que são responsáveis por alterações inflamatórias e resistência à insulina (Ye, 2009; Dodson *et al.*, 2011). Na presença de resistência à insulina, a mobilização de AGL de triglicérides (TG) dos estoques do tecido adiposo é acelerado. No fígado, os AGL resultam (devido a resistência à insulina hepática) em produção aumentada de glicose e TG e secreção aumentada da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL). Os AGL também reduzem a sensibilidade à insulina no músculo por inibir a captação de glicose mediada por insulina e aumentar a produção de fibrinogênio e inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1) (Kahn *et al.*, 2001; Cornier *et al.*, 2008). Dentre as adipocinas, temos leptina, resistina, fator de necrose tumoral (TNF)-alfa, interleucina (IL)-6, e ANG II, juntamente com PAI-1 (Matsuzawa, 2008).

Tabela 1 – Definições para o diagnóstico da síndrome metabólica no homem.

OMS 1999	NCEP-ATPIII 2001	IDF 2005	EGIR 1999
Resistência à insulina + pelo menos dois dos seguintes critérios:	Três ou mais dos seguintes critérios:	**Obesidade central*** + pelo menos dois dos critérios abaixo:	**Resistência à insulina** + pelo menos dois dos critérios abaixo:
Obesidade: IMC > 30 ou razão cintura/quadril > 0,90 (H) e > 0,85 (M)	**Obesidade abdominal:** circunferência da cintura > 102 cm (H) ou > 88 cm (M)	**Dislipidemia:** triglicérides > 150 mg/dL ou HDL < 50 mg/dL (M) ou < 40 mg/dL (H)	**Obesidade abdominal:** circunferência da cintura > 94 cm (H) ou > 80 cm (M)
Dislipidemia: triglicérides > 150 mg/dL ou HDL < 40 mg/dL (M) ou < 35 mg/dL (H)	**Dislipidemia:** triglicérides > 150 mg/dL ou HDL < 50 mg/dL (M) ou < 40 mg/dL (H)	**Hipertensão:** > 130 mmHg sistólica ou > 85 mmHg diastólica	**Dislipidemia:** triglicérides > 200 mg/dL ou HDL < 40 gm/dL
Hipertensão: > 140 mmHg sistólica ou > 90 mmHg diastólica	**Hipertensão:** > 140 mmHg sistólica ou > 85 mmHg diastólica	**Glicemia de jejum:** > 100 mg/dL	**Hipertensão:** > 140 mmHg sistólica ou > 90 mmHg diastólica
Microalbuminúria: excreção de albumina > 20 μg/min	**Glicemia de jejum:** > 110 mg/dL		**Glicemia de jejum:** > 110 mg/dL

*valores de referência diferentes de acordo com o grupo étnico.
Abreviações: OMS, Organização Mundial da Saúde; NCEP-ATP III, Programa Nacional de EEducação do Colesterol – Terceiro Painel de Tratamento do Adulto; IDF, Federação Internacional de Diabetes (International Diabetes Federation); EGIR, Grupo Europeu para o Estudo da Resistência Insulínica; IMC, índice de massa corpora; HDL, lipoproteína de alta densidade; H, homens; M, mulheres.

Os principais componentes da SM são dislipidemia (TG elevados e lipoproteínas contendo apolipoproteína B (apo B) e lipoproteínas de alta densidade (HDL) reduzida), pressão arterial elevada e distúrbio da homeostase de glicose. Também a obesidade abdominal e/ou resistência à insulina ganham cada vez mais atenção como manifestações centrais da síndrome (Kassi *et al.*, 2011). Lipoproteína de baixa densidade (LDL) aumentada, HDL reduzida e altas concentrações de TG são individualmente associadas com o risco de doenças cardiovasculares (Giugliano *et al.*, 2006). A dislipidemia pode ser consequência de um efeito metabólico global da resistência à insulina e um excesso de gordura visceral e gordura hepática.

A obesidade central está associada com o aumento do risco cardiovascular e diabetes tipo 2 (Zhu *et al.*, 2002). Apesar de não ser por si só um fator utilizado para o diagnóstico de SM, a obesidade está diretamente associada ao desenvolvimento da resistência à insulina (Bjorntorp, 1993).

O padrão de distribuição da gordura corporal parece ser determinante para o desenvolvimento da resistência à insulina e SM, pois nem todos os indivíduos obesos apresentam resistência à insulina (Abbasi *et al.*, 2002). Há evidências suficientes de que a gordura visceral intra-abdominal esteja intimamente ligada à resistência à insulina, daí a ênfase dada atualmente à avaliação da circunferência abdominal e a relação cintura-quadril, parâmetros amplamente utilizados como critérios de avaliação de risco cardiovascular decorrente da obesidade, ao invés do uso do índice de massa corporal (---, 2004a). Mesmo em indivíduos com massa corporal normal, o aumento da circunferência abdominal está associado ao risco cardiovascular aumentado. Nesse contexto, indivíduos com excesso de gordura visceral são mais propensos às anormalidades diabetogênicas e aterogênicas.

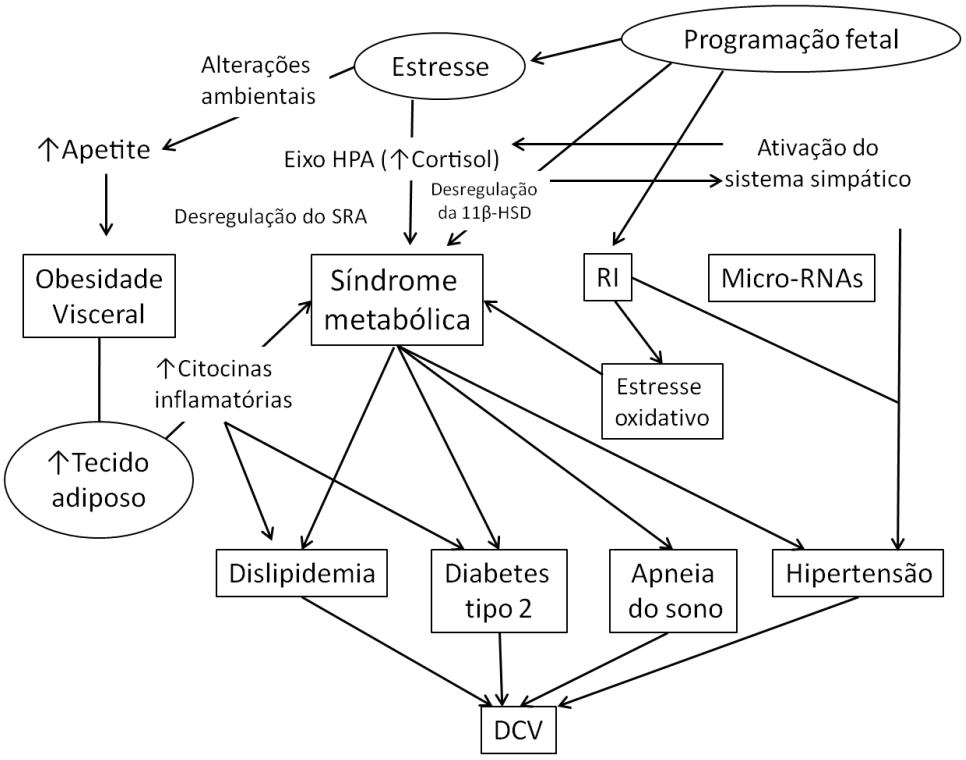


Figura 1 – Fisiopatologia da síndrome metabólica. Abreviações: DCV, doença cardiovascular; Eixo HPA, eixo hipotalâmico-pituitário (hipofisário)-suprarrenal; RI, resistência insulínica; 11β-HSD, 11β-hidroxiesteroide desidrogenase. Adaptada de Kassi, E., et al., *Metabolic syndrome: definitions and controversies.* BMC Med, 2011. **9**: p. 48.

2.1.2. Modelos experimentais

Roedores são muito utilizados para mimetizar doenças humanas e melhorar o entendimento das causas e da progressão das doenças, e para testar intervenções terapêuticas potenciais.

A dieta moderna, especialmente a dos países Ocidentais, é rica em carboidratos, como frutose e sucrose, bem como em gordura. O aumento da ingestão de calorias está associado com muitas complicações induzidas por dieta incluindo SM, doenças cardiovasculares e NAFLD (Lim *et al.*, 2010; Massiera *et al.*, 2010). A combinação de carboidratos e gorduras nos componentes da dieta tem sido usada em roedores para mimetizar os sinais e sintomas da SM em humanos.

A padronização dos ingredientes utilizados no que se refere à quantidade e qualidade dos nutrientes foi possível pela publicação de um documento que estabeleceu o requerimento de macronutrientes e micronutrientes para roedores nas diferentes fases da vida (Reeves, 1989; Reeves *et al.*, 1993). Desta froma, dietas ricas em lipídios têm sido usadas para induzir obesidade, dislipidemia e resistência à insulina em roedores. Em camundongos, a dieta hiperlipídica aumenta a pressão arterial sistólica e induz a disfunção endotelial (Kobayasi *et al.*, 2010).

Diferentes tipos de dietas hiperlipídicas têm sido usados com frações de gordura variando entre 20% a 60% de energia, assim como a origem da gordura, se animal, como banha de porco e sebo, ou óleos de plantas, como óleo de oliva ou de coco (Buettner *et al.*, 2006). Roedores alimentados cronicamente com dieta hiperlipídica têm a massa corporal aumentada (Lei *et al.*, 2007; Sutherland *et al.*, 2008) com o desenvolvimento de hiperglicemia (Kim *et al.*, 2010; Sweazea *et al.*, 2010).

Os modelos animais mais úteis para o estudo das doenças cardiovasculares e metabólicas são os pequenos roedores. Camundongos C57Bl/6 emergem como um modelo ao estudo da SM em roedores visando comparações com humanos. Eles apresentam vulnerabilidade genética e sofrem forte influência de fatores ambientais no desenvolvimento de obesidade, resistência à insulina e diabetes tipo 2 (Collins *et al.*, 2004; Fraulob *et al.*, 2010).

2.2. **Sistema renina-angiotensina e o controle da hipertensão arterial**

2.2.1. Sistema renina-angiotensina e angiotensina II

O bloqueio do SRA pode ser uma estratégia de tratamento eficaz para o controle de distúrbios da glicose e tolerância à insulina e dislipidemias em pacientes com SM. Hiperglicemia, resistência à insulina, e alteração de metabólitos do colesterol ativam componentes necessários para a síntese (angiotensinogênio, renina e enzima conversora da angiotensina, ECA), degradação (ECA 2), e resposta (AT1R e receptores *Mas*) para peptídeos de ANG em vários tipos celulares (por ex. células das ilhotas pancreáticas, adipócitos e macrófagos) que estão envolvidos nas alterações da SM. A ativação local do SRA nesses tipos celulares pode contribuir para desregular suas funções devido ao estresse oxidativo, apoptose, e inflamação (Putnam *et al.*, 2012).

O SRA regula a pressão arterial e o balanço de fluidos do corpo. A perfusão renal diminuída induz as células justaglomerulares renais a secretar a enzima renina, que cliva o angiotensinogênio (zimogênio inativo secretado principalmente pelo fígado) convertendo-o em angiotensina I (ANG I). ANG I é, então, convertido em ANG II, um octapeptídeo, pela ação da ECA, encontrada no endotélio vascular de vários tecidos (Paul *et al.*, 2006). A ANG II regula a pressão arterial e media seus efeitos vasoconstritores por estimulação de seus receptores no músculo liso vascular. ANG II também estimula a secreção de aldosterona a partir do córtex da suprarrenal. A aldosterona leva a um aumento da reabsorção de sódio e água pelos túbulos renais, aumentando o volume de fluido no corpo, o qual também aumenta a pressão arterial. Se o SRA está superativado, a pressão arterial torna-se alta.

ANG II tem um papel-chave no desenvolvimento do remodelamento vascular induzido por hipertensão e no dano cardiovascular (Savoia *et al.*, 2011). ANG II exerce suas ações biológicas pela ligação de alta afinidade com dois subtipos de receptores distintos, o AT1R e o AT2R. O AT1R ativa rotas de promoção do crescimento, estimula a maioria dos efeitos da ANG II (tais como vasoconstrição, aumento da pressão arterial, contratilidade cardíaca, absorção de sódio pelos túbulos renais e proliferação celular) e efeitos adversos (tais como

estresse oxidativo, disfunção endotelial, doenças cardiovasculares e inflamação) (Mehta e Griendling, 2007). Em contraste, AT2R induz efeitos opostos, como vasodilatação, hipotensão, diminuição do crescimento por apoptose, e efeitos anti-hipertróficos e a possível inibição de AT1R (Nakajima *et al.*, 1995; Yamada *et al.*, 1996; AbdAlla *et al.*, 2001) (Figura 2).

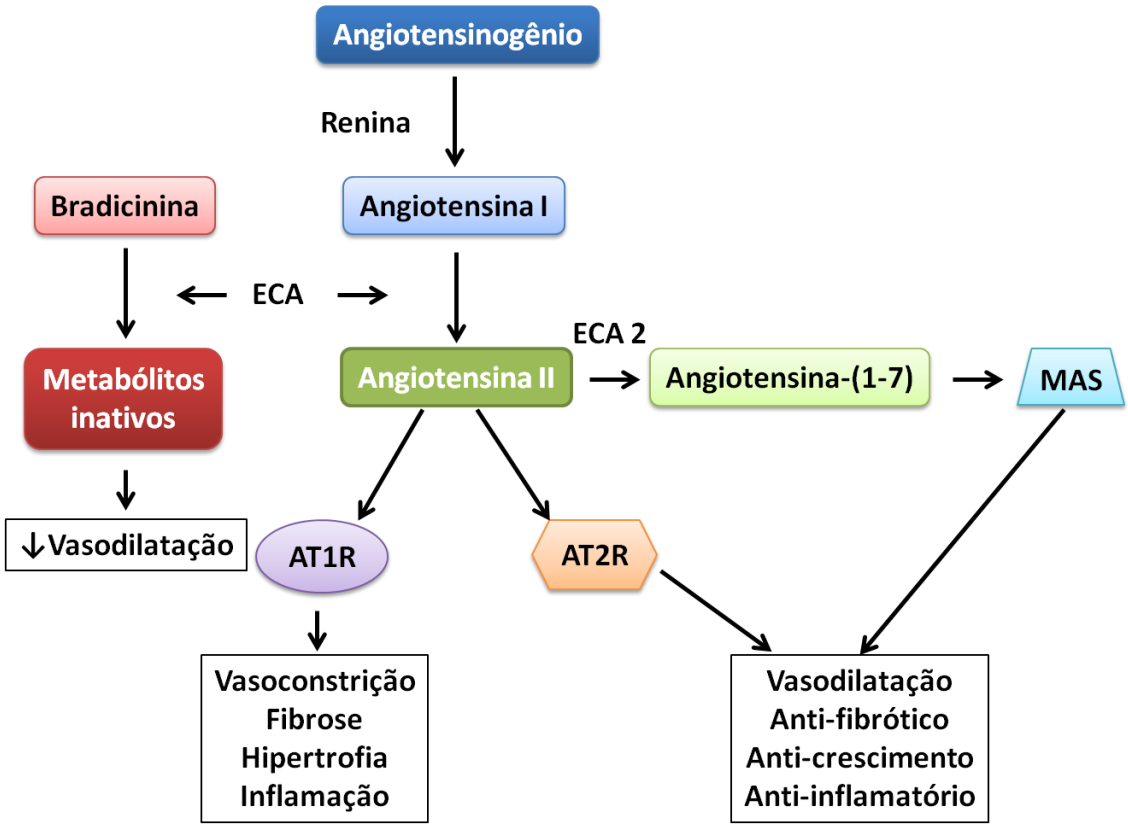


Figura 2 – Sistema renina-angiotensina. Abreviações: AT1R, receptor tipo 1 de angiotensina II; AT2R, receptor tipo 2 de angiotensina II; ECA, enzima conversora de angiotensina; MAS, receptor da angiotensina-(1-7). Adaptada de Cat AN and Touyz RM, *A new look at the renin-angiotensin system--focusing on the vascular system.* Peptides, 2011. **32**: 2141-50.

2.2.2. Receptor tipo 1 de angiotensina II

Os AT1Rs são expressos em todos os órgãos, incluindo coração, rins, fígado, suprarrenais, cérebro, pulmões e vasos (Paul *et al.*, 2006). AT1R é expresso em todas as células do sistema cardiovascular, como células endoteliais, células musculares lisas, fibroblastos, monócitos, macrófagos e monócitos cardíacos, assim, o AT1R é crucial na biopatologia cardiovascular (Gao *et al.*, 2008; Zucker *et al.*, 2009). Estruturalmente, AT1Rs pertencem a superfamília da proteína transmembrana-7 dos receptores acoplados a proteína-G. Os AT1Rs ativados podem ativar múltiplas rotas de sinalização. A função vasoconstritora da ANG II é mediada principalmente através do AT1R por meio de mecanismos de sinalização dependentes da proteína-G (Ushio-Fukai *et al.*, 1999).

Através do AT1R, a ANG II também é um potente mediador do estresse oxidativo e de espécies reativas de oxigênio, promovendo disfunções cardiovasculares associadas com hiperlipidemia, diabetes, hipertensão arterial, doença cardíaca isquêmica e insuficiência cardíaca crônica (Taniyama e Griendling, 2003). A disfunção endotelial, no contexto da hipertensão arterial e de doenças cardiovasculares, é parcialmente dependente da produção de espécies reativas de oxigênio, que não apenas destrói o óxido nítrico (ON), mas também reduz a formação de ON no endotélio por oxidação da tetrahidrobiopterina, um cofator crucial para a síntese de ON endotelial (Schulz *et al.*, 2008). A hipertensão arterial assim provocada, leva ao remodelamento cardíaco que é mediado, em nível molecular, pelo SRA, fator de crescimento de transformação-beta (TGF-beta) e pelo sistema beta-adrenérgico. Existe uma relação direta entre o SRA e TGF-beta 1 no remodelamento cardíaco, onde o crescimento hipertrófico dos cardiomiócitos induzido por ANG II é mediado por TGF-beta 1 (Campbell e Katwa, 1997; Kupfahl *et al.*, 2000).

2.2.3. Receptor tipo 2 de angiotensina II

Como o AT1R, o AT2R também pertence à superfamília de receptores acoplados a proteína-G. AT2R é altamente expresso no coração e na aorta fetal, sendo expresso em níveis modestos nos rins, pulmões e fígado. A expressão de AT2R cai rapidamente após o nascimento, o que sugere que ele tem importante papel no desenvolvimento fetal (Shanmugam *et al.*, 1995). Porém, sua expressão pode ser induzida tardiamente no adulto em condições patlógicas (Tsutsumi *et al.*, 1998). As ações do AT2R contrabalanceiam as do AT1R. Por causa de suas propriedades pró-apoptóticas, antiprofliferativas e vasorelaxantes, o AT2R pode controlar outros processos fisiológicos, como o remodelamento (por inibir o crescimento celular e estimular a apoptose, minimizando, assim, a hipertrofia), pressão arterial (por vasodilatação), natriurese e atividade neuronal (Elbaz *et al.*, 2000; AbdAlla *et al.*, 2001). Há associação entre AT2R e receptores B2 de bradicinina causando a liberação de óxido nítrico (Katada e Majima, 2002).

2.2.4. Sistema renina-angiotensina cardíaco local

Existe um SRA local no coração (De Mello e Danser, 2000; Bader, 2002). Em animais com hipertensão arterial, a ANG II cardíaca, ativada via AT1R, aumenta a inflamação, o estresse oxidativo e a morte celular (via diminuição da regulação da proteína quinase fosfatidilinositol-3 (PI-3) e da proteína quinase B (Akt)), contribuindo, desta forma, para a hipertrofia e fibrose cardíaca (van Kats *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2010b). O SRA intrácrino é um importante componente do SRA local (De Mello, 2004; Re e Cook, 2008) que está envolvido na indução de hipertrofia celular (Kumar *et al.*, 2008), arritmias cardíacas (De Mello, 2001), bem como no controle do volume da célula cardíaca (De Mello, 2011). O aumento da geração de ANG II nos ventrículos de animais transgênicos acarreta hipertrofia cardíaca (Kumar *et al.*, 2008), sugerindo que a produção intracelular de ANG II é responsável pelo remodelamento cardíaco.

2.2.5. Hipertensão arterial, obesidade, resistência insulínica e SRA

Além de estar envolvido na gênese da hipertensão arterial, o SRA tem sido implicado na etiologia da obesidade e da resistência à insulina, como uma ligação entre obesidade, diabetes e hipertensão arterial (Boustany *et al.*, 2004; Schmieder *et al.*, 2007). A ANG II diminui a sensibilidade à insulina, com isso a hipertensão arterial, uma característica-chave da atividade do SRA, é frequentemente associada com a resistência à insulina (Ferrannini *et al.*, 1989).

A ANG II é um potente e bem conhecido vasoconstritor e variações no fluxo sanguíneo são fatores pra o controle da captação de glicose mediada pela insulina (Vincent *et al.*, 2005; Barrett *et al.*, 2009). Outros mecanismos propostos para a redução da sensibilidade à insulina pela ANG II incluem a diminuição de adipogênese e produção de adiponectina (Sharma *et al.*, 2002; Ran *et al.*, 2006), inibição da translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) (Wei *et al.*, 2008), aumentando as espécies reativas de oxigênio e a inflamação (Wei *et al.*, 2008) e aumentando o estoque de gordura ectópica (Sloniger *et al.*, 2005).

Quando o indivíduo perde peso, a massa do tecido adiposo e a atividade do SRA sistêmico são reduzidas (Strazzullo e Galletti, 2004; Engeli *et al.*, 2005). O tecido adiposo também expressa os elementos do SRA e é uma fonte predominante de angiotensinogênio (Cassis *et al.*, 1996; Mallow *et al.*, 2000), podendo gerar ANG II local para estimular AT1R e AT2R no adipócito, como também contribui para a atividade da ANG II em tecidos mais distantes. Em humanos e em modelos animais, o SRA sistêmico é correlacionado positivamente com a massa corpórea e, mais especificamente, com a gordura corporal, assim, a perda de peso está associada com atividade diminuída do SRA sistêmico e do tecido adiposo (Rahmouni *et al.*, 2004; Engeli *et al.*, 2005). Na obesidade induzida por dieta há aumento do angiotensinogênio do tecido adiposo (Boustany *et al.*, 2004; Rahmouni *et al.*, 2004). O SRA do tecido adiposo altera o metabolismo da célula adiposa: contribui para a hipertrofia do adipócito (Jones *et al.*, 1997), adipogênese (Crandall *et al.*, 1999), inflamação (Yvan-Charvet *et al.*, 2009), aumenta a secreção de leptina (Cassis *et al.*, 2004) e diminui a secreção de adiponectina (Ran *et al.*, 2006).

O SRA também interfere no metabolismo de AGL no fígado via ativação do AT1R e AT2R. A produção de glicose hepática é um importante contribuinte para a manutenção

adequada dos níveis de glicose. Existem evidências para o SRA local no fígado (Paizis *et al.*, 2002) que é modulado pelo peso corporal (Munoz *et al.*, 2006; Takeshita *et al.*, 2008).

2.3. **Tecido Adiposo**

O tecido adiposo contribui para o desenvolvimento da resistência à insulina, hiperglicemia, dislipidemia aterogênica, e hipertensão arterial, e favorece para um estado pró-trombótico e pró-inflamatório (Allende-Vigo, 2010). As funções clássicas descritas para o tecido adiposo são: isolante térmico, amortecedor de choques e armazenamento de gordura na forma de TG (Hutley e Prins, 2005; Ronti *et al.*, 2006). O tecido adiposo também secreta substâncias endócrinas ativas, parácrinas e autócrinas em resposta a diferentes estímulos. Alguns deles são liberados no próprio tecido adiposo (por ex. leptina, adiponectina) enquanto outros são compartilhados com outros sistemas (por ex., TNF-alfa), assim, entrelaça suas funções com a regulação sistêmica de todo o organismo.

O tecido adiposo é composto principalmente por adipócitos esféricos, células gordurosas uniloculares, suportadas por um tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado. O tamanho do adipócito varia de acordo com o conteúdo lipídico celular, variando entre 30 e 130 µm de diâmetro. O volume do adipócito é um determinante da funcionalidade celular, onde adipócitos grandes exibem alta atividade metabólica e secretam mais quimioatraentes para células do sistema imune (Skurk *et al.*, 2007). Nos adipócitos maduros, uma grande gotícula de lipídios preenche quase todo o volume da célula, sendo delimitada apenas por uma monocamada de lipídios reforçada por uma gama de proteínas estruturais (Ohsaki *et al.*, 2009).

Uma forte trama externa de tecido conjuntivo é um pré-requisito para a apropriada manutenção da célula gordurosa e a estrutura tecidual. Os adipócitos possuem uma lâmina basal e uma matriz extracelular com proteínas e proteoglicanos que mantêm a integridade do tecido adiposo (Mariman e Wang, 2010; Divoux e Clement, 2011). Outras células não adiposas do tecido adiposo incluem pré-adipócitos, fibroblastos, células endoteliais e vasos sanguíneos e linfáticos, macrófagos e outras células imunes (Ouchi *et al.*, 2011).

A matriz do tecido adiposo sofre remodelamento constante para acomodar as mudanças na quantidade de estoques de energia (Lee *et al.*, 2010). Essas alterações abrangem hipertrofia e hiperplasia, remodelamento da matriz extracelular, angiogênese e alterações na quantidade de células imunes. Estas alterações podem levar a uma inflamação local com subsequente liberação de mediadores pró-inflamatórios (Suganami e Ogawa, 2010), incluindo PAI-1 e proteína quimioatraente de monócito-1 (MCP-1), os quais também são potentes indutores de fibrose (Sell e Eckel, 2010). Fibrose progressiva e expansão da matriz extracelular em indivíduos obesos podem impor limites para a hipertrofia do adipócito e, assim, promover o armazenamento de lipídios e gorduras ectópicas (Szendroedi e Roden, 2009).

As principais funções do tecido adiposo são a de centro regulatório do metabolismo de energia e a de centro para o armazenamento de energia. O tecido adiposo armazena TG proveniente dos nutrientes que são incorporados aos adipócitos em resposta à estimulação dada pela insulina. A lipoproteína lípase (LPL), anexada à camada endotelial dos vasos sanguíneos, hidrolisa TG de quilomicrons e VLDL, liberando AGL que podem ser transportados para dentro dos adipócitos. Quando há necessidade de energia, TG sofre lipólise, sendo hidrolisado pela lipase de TG adiposo (LTGA) e pela lipase hormônio-sensitiva (LHS). Os ácidos graxos resultantes podem, então, ser transportados pelo sangue para outros locais onde irão servir de substrato energético para a beta-oxidação na mitocôndria.

O tecido adiposo também está envolvido na regulação da homeostasia da glicose e na sensibilidade à insulina. Os adipócitos captam glicose através dos transportadores GLUT4. A sensibilidade à insulina dos tecidos periféricos é modulada por adipocinas e pelo fluxo de AGL (Miyazaki *et al.*, 2002). Além disso, o tecido adiposo regula a homeostasia e o estado nutricional do corpo por secretar citocinas com propriedades anti- e pró-inflamatórias (TNF-alfa e IL-6) (Fain *et al.*, 2004; Ouchi *et al.*, 2011) (Figura 3). Na obesidade, a desregulação do balanço entre as citocinas pró- e anti-inflamatórias liberadas pelo tecido adiposo resultam em um estado crônico de inflamação e contribui para desordens metabólicas e cardiovasculares (Xu *et al.*, 2010a; Ouchi *et al.*, 2011).

A leptina e a adiponectina são as adipocinas mais estudadas até o momento, e sabe-se que ambas exercem efeitos regulatórios no hipotálamo, fígado, ilhotas pancreáticas e músculo esquelético (Smith *et al.*, 2005). A leptina funciona como um sinal de feedback negativo na regulação da massa corporal. A obesidade está frequentemente associada com hiperleptinemia, refletindo um estado de resistência à ação da leptina em indivíduos obesos,

uma vez que eles permanecem com peso elevado apesar dos altos níveis de leptina circulantes (Caro *et al.*, 1996). A adiponectina é uma citocina anti-inflamatória que possui ação tanto de sensibilização à insulina quanto anti-aterosclerótica. Semelhante à leptina, a produção de adiponectina também responde ao estado energético sistêmico. Entretanto, enquanto a adiposidade eleva os níveis plasmáticos de leptina, ela reduz significativamente os níveis de adiponectina (Weyer *et al.*, 2001).

A distribuição de gordura em vários locais do corpo afeta o desenvolvimento e a progressão das doenças metabólicas mais que a massa de gordura total. Papéis diferentes de depósitos de gordura regional resultam, na patologia, de diferenças em suas estruturas, expressão de proteínas, respostas a estímulos endócrinos e nervosos, bem como o suprimento local de oxigênio, nutrientes e hormônios. A distribuição corpórea de tecido adiposo pode ser dividida em dois maiores depósitos: gordura visceral e subcutânea. O tecido adiposo visceral envolve órgãos da cavidade abdominal e mediastino, enquanto que o tecido adiposo subcutâneo forma uma camada de gordura abaixo da pele, como, por exemplo, na hipoderme. Especialmente a gordura visceral é correlacionada com anormalidades metabólicas diabetogênicas, aterogênicas, pró-trombóticas e pró-inflamatórias como as referidas na SM, que são acompanhadas por disfunção de adipócitos e produção desregulada de adipocinas (por ex. hipoadiponectinemia) (Kishida *et al.*, 2011).

2. 4. **Fígado e resistência insulínica**

2.4.1. Resistência insulínica

A habilidade da insulina para estimular a disponibilidade de glicose varia mais de seis vezes em indivíduos aparentemente saudáveis. Um terço da população que é resistente à insulina tem risco aumentado para desenvolver doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, hipertensão arterial, esteatose hepática não alcoólica, doença dos ovários policísticos e certas formas de câncer. Cerca de 25 a 35% da variabilidade da ação da insulina está relacionada

com o sobrepeso. Embora a maioria dos indivíduos que podem ser considerados insulino-resistentes também apresentarem sobrepeso/obesidade, nem todas as pessoas com sobrepeso/obesidade apresentam resistência à insulina. Além disso, o conjunto de anormalidades associadas com resistência à insulina (intolerância à glicose, hiperinsulinemia, dislipidemia e elevada concentração plasmática de proteína C-reativa) é limitado aos indivíduos com sobrepeso/obesidade que também são insulino-resistentes (Reaven *et al.*, 2004).

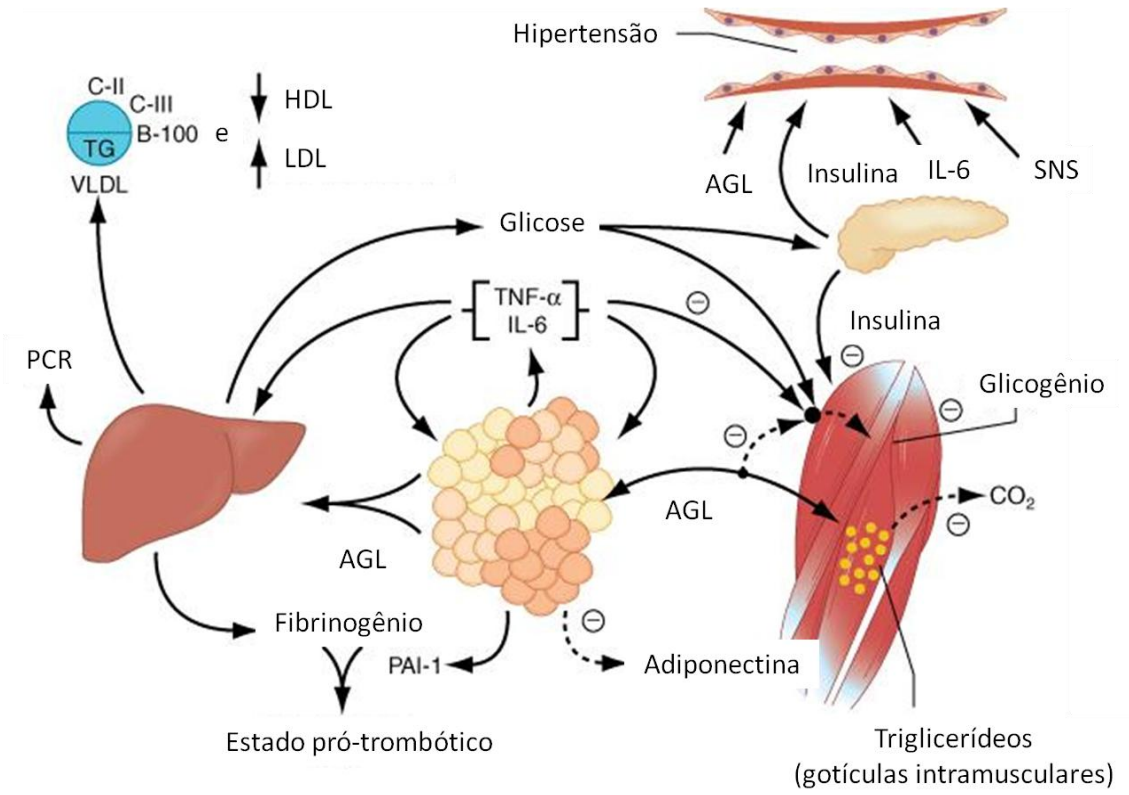


Figura 3 – Tecido adiposo na resistência insulínica. Abreviações: AGL, ácidos graxos livres; CO_2, dióxido de carbono; PCR, proteína C reativa; HDL, lipoproteína de alta densidade; IL-6, interleucina-6; LDL, lipoproteína de baixa densidade; PAI-1, inibidor do ativador de plasminogênio; SNS, sistema nervoso somático; TG, triglicérides; VLDL, lipoproteína de muito baixa densidade. Adaptada de Fauci AS, Kasper DL, Braunwald E, Hauaser SL, Jameson JL, Loscalzo J: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th Edition: HTTP://www.accessmedicine.com

A insulina é o maior hormônio anabólico, cuja ação é importante para o desenvolvimento e crescimento dos tecidos e para a homeostasia da glicose. Ela é secretada pelas células beta-pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis de glicose e aminoácidos circulantes, o que ocorre principalmente no período pós-prandial (Chen *et al.*, 1987). A insulina normalmente controla a homeostasia da glicose em diferentes sítios, reduzindo a produção hepática de glicose (promovendo menores taxas de glicogenólise e gliconeogênese), estimulando a captação de glicose nos tecidos periféricos, aumentando a síntese hepática de lipídios e suprimindo a liberação de ácidos graxos do tecido adiposo (Shulman, 2000) (Figura 4). Defeitos na secreção e ação da insulina conduzem a múltiplas alterações metabólicas tais como hiperglicemia, aumento da produção hepática de glicose e dislipidemia (Muoio e Newgard, 2008).

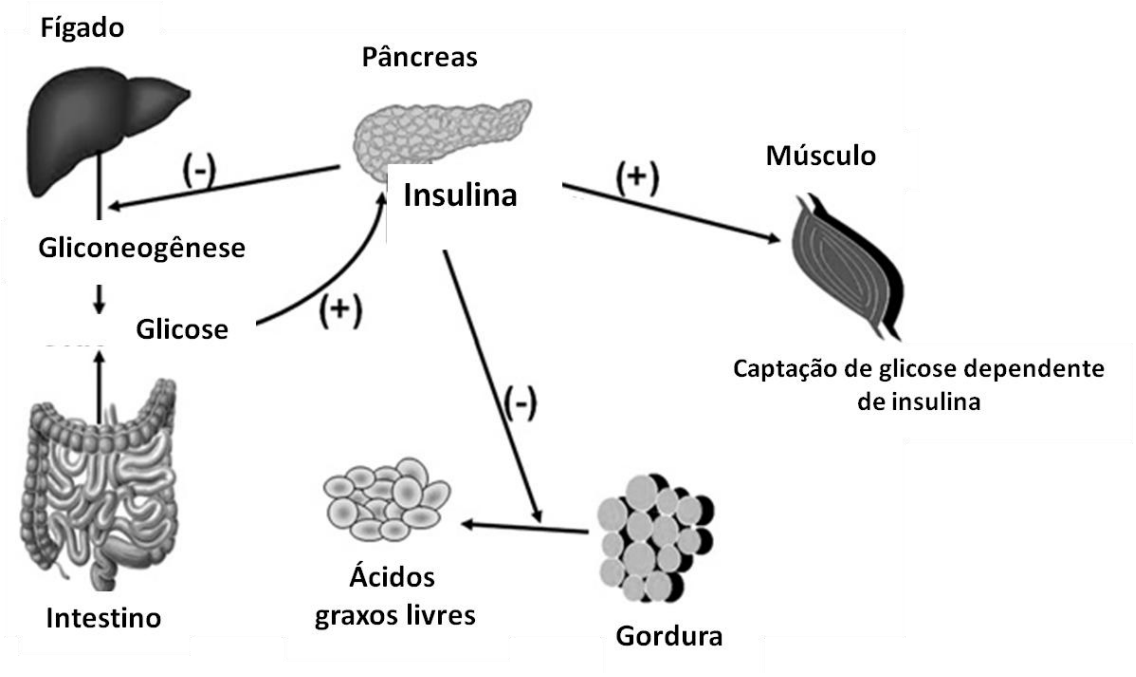


Figura 4 – Resumo da função biológica da insulina. Adaptada de Eslam M, Khattab MA, Harrison SA, *Insulin resistance and hepatitis C: an evolving story*. Gut, 2011 **60**: 1139-51.

A resistência à insulina é uma condição onde níveis normais de insulina não são capazes de produzir uma resposta normal da gordura, músculo e fígado (Bloomgarden, 2007) e geralmente tem início anos antes do diagnóstico de diabetes tipo 2 (Harris e Eastman, 2000). A hipertrofia das ilhotas e hipersecreção de insulina surge na tentativa de compensar o estado de resistência e promover valores normais de glicemia num primeiro momento. Entretanto, esse trabalho exaustivo promove deterioração progressiva das ilhotas de maneira que 50% da função das ilhotas pancreáticas já estão perdidas no momento do diagnóstico de hiperglicemia, momento onde a intolerância oral à glicose já está instalada (Taylor, 1999; Yoon *et al.*, 2003).

O aumento dos depósitos de tecido adiposo e das taxas de lipólise, associados ao sobrepeso, fazem com que os AGL circulantes sejam desviados e armazenados em órgãos sensíveis à insulina, tais como o fígado, o pâncreas e o músculo esquelético (Unger e Orci, 2000). Esse acúmulo ectópico de lipídios está envolvido na gênese da resistência à insulina e no comprometimento da função das células beta-pancreáticas, efeito conhecido como lipotoxicidade (Savage *et al.*, 2005).

A resistência à insulina em indivíduos sem predisposição genética para o diabetes tipo 2 pode ser induzida pelo aumento de AGL (por infusão de lipídios ou dieta hiperlipídica) e resulta no acúmulo intramiocelular de acil-CoA gordurosa (FACoA) (Roden, 2005). Desta maneira, a resistência à insulina pode aumentar a partir do acúmulo de gordura ectópica (Lettner e Roden, 2008) como consequência de um defeito genético da fosforilação oxidativa mitocondrial ou perda da função mitocondrial com o envelhecimento (Morino *et al.*, 2006).

AGL aumentados, acúmulo intramiocelular de FACoA e seus metabólitos diacilglicerol e ceramida (Boden, 2008) podem provocar a fosforilação serina em resíduos chaves do substrato do receptor de insuina-1 (SRI-1) (Morino *et al.*, 2006). A fosforilação serina de SRI-1, diferente da sua fosforilação tirosina, inibe a propagação da sinalização de insulina com ativação da PI-3 e da translocação do GLUT4 em resposta à insulina (Morino *et al.*, 2006); por isso desenvolve resistência à insulina no músculo esquelético. Similar a SRI-1, SRI-2 também interage com o domínio justamembrana do receptor de insulina: o aumento da fosforilação serina/treonina de SRI-1 e SRI-2 abole a habilidade destes dois substratos de receptores submeter-se a fosforilação tirosina induzida por insulina e a propagação do sinal do receptor de insulina (Paz *et al.*, 1997).

O aumento de AGL no citoplasma do adipócito leva a uma resposta inflamatória através da produção de citocinas como TNF-alfa, IL-6 e metaloproteinases, que contribuem

significativamente para a resistência à insulina (Wellen e Hotamisligil, 2005). Quando a taxa de liberação de AGL aumenta, há um distúrbio da capacidade de beta-oxidação devido à toxicidade mitocondrial e os AGL são liberados para fora dos adipócitos para a circulação e são depositados como TG ectópicos no músculo e no fígado, sendo associado com resistência à insulina, dano da célula beta e diabetes tipo 2 (Maassen *et al.*, 2007).

O aumento de TNF-alfa e de IL-6 também vem sendo relacionado com a alteração na fosforilação do IRS-1, caracterizada pelo aumento da fosforilação dos resíduos de serina em proteínas chaves como Akt, alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) e proteína quinase c-Jun-NH2-terminal (JNK), comprometendo a sinalização adequada da insulina e translocação do GLUT4 para a membrana (Hotamisligil *et al.*, 1996; Kern *et al.*, 2001).

Após ligação com seu receptor e a ativação da sua subunidade beta, a insulina se depara com duas rotas divergentes: uma é dependente de PI-3, enquanto a outra é dependente da ativação da proteína-quinase ativadora mitogênica (MAPK) (Cusi *et al.*, 2000) (Figura 5). A primeira é absolutamente necessária para mediar os efeitos metabólicos e anti-apoptóticos, e a segunda está ligada com efeitos não metabólicos, proliferativos e mitogênicos, no qual uma contribuição pode vir a partir da primeira (Montagnani *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004).

Em pacientes obesos, especialmente com diabetes tipo 2, PI-3 é totalmente ou parcialmente resistente à estimulação por insulina, embora MAPK seja sempre normal, por isso, a resistência à insulina é mais bem definida como resistência à insulina metabólica (Montagnani *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004). A hiperinsulinemia resultante é uma tentativa sem sucesso para superar a inibição da rota metabólica ao preço da estimulação sem oposição da rota MAPK. Desta maneira, podemos distinguir hipoinsulinização da rota metabólica da hiperinsulinização da rota mitogênica (Muntoni e Draznin, 2008).

2.4.2. Alterações hepáticas

A resistência à insulina total ou parcial ao longo da SM tem graves consequências. A resistência à insulina e a SM são associadas com a patogênese e progressão da NAFLD. Ela engloba um espectro de patologias hepáticas, variando desde uma esteatose simples em sua forma mais benigna (fígado gorduroso), passando pela esteatohepatite não alcoólica (NASH) em sua forma intermediária, até uma cirrose e um carcinoma hepatocelular, em sua forma mais avançada. As rotas metabólicas que levam ao desenvolvimento da esteatose hepática são múltiplas, incluindo o aumento de AGL liberados pelo tecido adiposo (lipólise), aumento *de novo* da síntese de ácidos graxos (lipogênese) e o aumento da beta-oxidação. A esteatose hepática é caracterizada pelo acúmulo intracelular de TG, que pode ser micro ou macrovesicular, dependendo da causa (Aguila *et al.*, 2010).

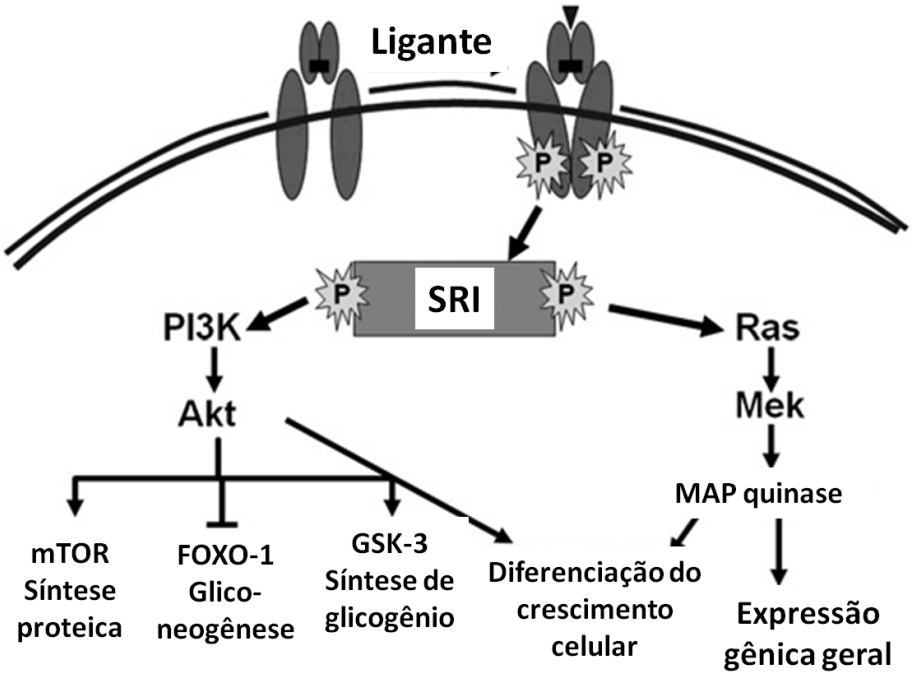


Figura 5 – Rotas de sinalização da insulina. Abreviações: Akt, protein quinase B; FOXO-1, fator de transcrição da forquilha-1; GSK-3, proteína quinase glicogênio sintase-3; SRI, substrato do receptor de insulina; Ras, proteína de sinalização Ras (*rat sarcoma virus* – vírus do sarcoma de ratos); MAP quinase, proteína quinase ativadora mitogênica; MEK, proteína quinase ativadora da adenosina monofosfato; mTOR, alvo da rapamicina em mamíferos; PI3K, quinase fosfatidilinositol 3 Adaptada de Eslam M, Khattab MA, and Harrison SA, *Insulin resistance and hepatitis C: an evolving story*. Gut, 2011 **60**:1139-51.

A captação prejudicada de glicose pelo músculo e a gliconeogênese hepática acelerada são as principais características da resistência à insulina no metabolismo de glicose. O fígado é preenchido com AGL liberados pela gordura visceral através da rota portal (DeFronzo *et al.*, 1992). O VLDL-TG hepático é parcialmente resistente (Lewis e Steiner, 1996), enquanto apoB é totalmente resistente aos efeitos inibitórios da insulina (Lewis *et al.*, 1993), pois o alto influxo de AGL protege o último do dano pós-transcricional (Sniderman e Cianflone, 1993). Como consequência, partículas ricas em apoB e VLDL-1, que são precursoras de LDL, são produzidas na resistência à insulina (Taskinen, 2003). A NAFLD, devido ao acúmulo excessivo de TG, relacionada ao fluxo aumentado de AGL e da lipogênese, é uma das mais frequentes causas de disfunção hepática (Taskinen, 2003; Postic e Girard, 2008).

Nos estados de resistência à insulina, a carga excessiva de AGL é direcionada à lipogênese (esterificação), conduzindo ao acúmulo de TG no interior desse órgão que não é destinado a essa função, configurando a condição patológica conhecida como esteatose hepática (Holness e Sugden, 1999; Duvnjak *et al.*, 2007) (Figura 6). A lipogênese *de novo* e o armazenamento de gordura, relacionados com o aumento de glicose e insulina circulantes, ocorre via aumento dos níveis hepáticos de malonil-CoA e inibição da atividade da carnitina-palmitoilaciltransferase-1 (CPT-1) (Chien *et al.*, 2000).

Este processo é regulado por fatores de transcrição ativados por insulina, especialmente a proteína de ligação ao elemento regulador do esterol-1c (SREBP-1c) (Chen *et al.*, 2004), assim como pelo receptor ativador da proliferação peroxissomal-gama (PPAR-gama). SREBP-1c, no estado de resistência à insulina, promove incremento da transcrição de genes de enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos, entre elas a acetil-CoA carboxilase (ACC), que converte a acetil-CoA em malonil-CoA e a ácido graxo sintetase (FAS), que converte a malonil-CoA em palmitato (Shimomura *et al.*, 2000; Sakakura *et al.*, 2001). PPAR-gama aumenta a sensibilidade à insulina e a capacitação de ácido graxo por promover diferenciação dos adipócitos e a expressão de proteínas envolvidas na síntese de AGL no tecido adiposo, como também limita o influxo de ácido graxo no fígado (Gavrilova *et al.*, 2003).

A esteatose hepática ocorre sempre que o "*input*" de ácidos graxos (captação, síntese ou esterificação) excede o "*output*" (oxidação e secreção de VLDL), resultando no acúmulo principalmente de TG nos hepatócitos (Neuschwander-Tetri e Caldwell, 2003; Abdelmalek e Diehl, 2007).

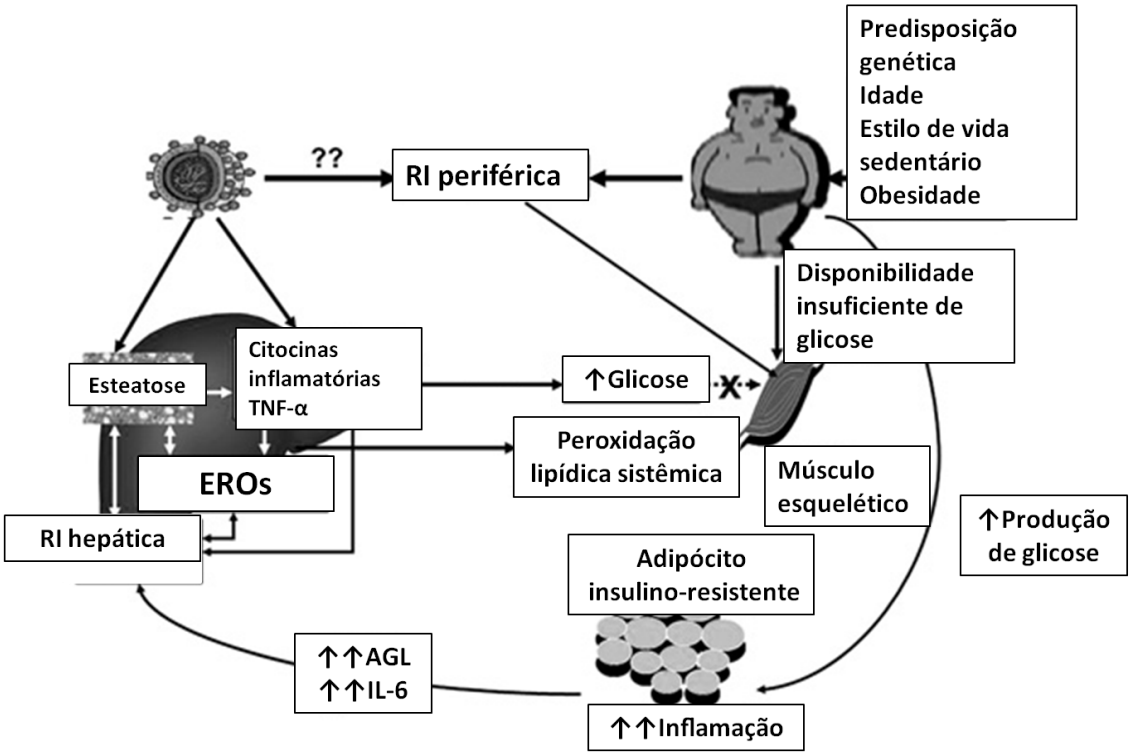


Figura 6 – Esteatose hepática e resistência insulínica. Abreviações: AGL, ácidos graxos livres; EROs, espécies reativas de oxigênio; IL-6, interleucina-6; RI, resistência insulínica; TNF-α, fator de necrose tumoral-α. Adaptada de Eslam M, Khattab MA, and Harrison SA, *Insulin resistance and hepatitis C: an evolving story.* Gut, 2011 **60**:1139-51.

Os ácidos graxos não incorporados aos TG são degradados por oxidação dentro da mitocôndria, peroxissomo e microssomo. A beta-oxidação de ácidos graxos é regulada por PPAR-alfa (Reddy e Hashimoto, 2001). A oxidação mitocondrial de ácidos graxos gera superóxido, adenosina trifosfato (ATP), corpos cetônicos, e acetil-CoA. Na NAFLD, a oxidação mitocondrial fica limitada, levando a uma oxidação peroxissomal (e microssomal) que gera peróxido de hidrogênio, uma fonte potencial de estresse oxidativo (Macdonald e Prins, 2004). espécies reativas de oxigênio também são produzidas quando ácidos graxos sofrem beta-oxidação pelo citocromo p450 dentro dos microssomos (Leclercq *et al.*, 2000; Chalasani *et al.*, 2003).

Em contraste, a rota MAPK permanece insulino-sensitiva (Cusi *et al.*, 2000) e, sendo hiperinsulinizada, produz uma série de efeitos nucleares e mitogênicos relacionados com a

ativação da troca de Na+/H+ de membrana e com 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA R), a partir do qual uma série de efeitos importantes acontece.

A esteato hepatite não alcoólica, que frequentemente progride para fibrose e cirrose, é promovida por hiperglicemia e hiperinsulinemia compensatória (Neuschwander-Tetri, 2002; Ma e Li, 2006) através da estimulação do fator de crescimento do tecido conjuntivo nas células hepáticas estreladas (Paradis *et al.*, 2001), devido ao envolvimento da troca de Na+/H+ na proliferação das células estreladas (Haussinger, 2001), como em muitos outros efeitos da rota MAPK.

Em adição, a síntese e a liberação de PAI-1 pelos hepatócitos são estimuladas pela insulina, e uma forte correlação existe entre os níveis plasmáticos de insulina e PAI-1; desde que PAI-1 pode aumentar o risco de trombose da artéria coronária, este inibidor da fibrinólise é uma das ligações entre hiperinsulinemia e infarto do miocárdio (Juhan-Vague *et al.*, 1989).

2. 5. **Receptores ativadores da proliferação peroxissomal**

2.5.1. PPARs

PPARs fazem parte da família de receptores hormonais nucleares que capacitam a célula a responder a estímulos extracelulares por regulação transcricional da expressão gênica (Grommes *et al.*, 2004). Existem três isoformas de PPARs: PPAR-alfa, PPAR-beta/ômega e PPAR-gama, expressos em vários tecidos e apresentando várias funções.

O receptor PPAR-alfa é expresso predominantemente no fígado e pode ser encontrado também em tecido muscular esquelético, coração, endotélio e nos rins. Os principais ligantes endógenos do PPAR-alfa são os AGL. O principal papel do PPAR-alfa é a regulação da homeostase energética (Lefebvre *et al.*, 2006). Especialmente no fígado o PPAR-alfa ativa o catabolismo dos ácidos graxos, estimula a gliconeogênese, a síntese de corpos cetônicos, e

está envolvido no controle da montagem das lipoproteínas (Staels *et al.*, 1995; Reddy e Hashimoto, 2001).

O receptor PPAR-beta/ômega apresenta uma distribuição mais ampla, sendo expresso no fígado, músculo, intestino, tecido adiposo e sua ação fisiológica é mais relacionada ao metabolismo lipídico atuando na oxidação dos ácidos graxos (Willson *et al.*, 2000). O PPAR-beta/ômega possui um papel importante no controle da proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, assim como no reparo tecidual (Tan *et al.*, 2001; Michalik e Wahli, 2006).

Já o PPAR-gama é expresso principalmente no tecido adiposo, embora também seja expresso nas células beta pancreáticas, endotélio, macrófago e células hematopoiéticas (Willson *et al.*, 2000; Akbiyik *et al.*, 2004). Seu principal ligante endógeno é um derivado da prostaglandina D2 resultante do metabolismo do ácido araquidônico (Willson *et al.*, 2000). Também são descritos como ligantes metabólitos, derivados de ação da 15-lipoxigenase no ácido linoléico.

Os PPARs são ativados por ligantes específicos e são finamente ajustados por seus estados de fosforilação, induzido por proteína quinase A (PKA), MAPK e AMPK (Diradourian *et al.*, 2005). Estes receptores formam heterodímeros com receptores do retinóide X para o ácido 9-*cis*-retinóico (RXRs) (Kliewer *et al.*, 1994) para reconhecerem sequências específicas de DNA chamadas de elementos resposta PPAR (PPRE – PPAR *response elements*) localizados em genes alvos iniciadores de sua transcrição (Issemann *et al.*, 1993). O PPRE consiste na sequência “AGGTCA” separada por um nucleotídeo chamado DR-1 para indicar uma sequência repetida direta separada por um único nucleotídeo (A *et al.*, 1997; Gervois *et al.*, 1999). Interações proteicas têm papel importante na ativação dos PPARs. No estado inativado, PPARs formam complexos com proteínas correpressoras. Uma vez ativados por ligantes, PPARs se dissociam das proteínas correpressoras e recrutam coativadores, incluindo a proteína ligante PPAR e o receptor esteroide co-ativador-1, o qual pode translocar do citoplasma para o núcleo (Zhu *et al.*, 1996; Moraes *et al.*, 2006) (Figura 7).

2.5.2. Fenofibrato, um agonista PPAR-alfa

PPAR-alfa tem um importante papel no cenário da SM, com evidências que suportam um papel central coordenado na regulação de ácidos graxos, no metabolismo de lipídios e lipoproteínas, e nas respostas inflamatórias e vasculares. Dentre os seus ligantes farmacológicos, o fenofibrato tem uma aplicação clínica importante no risco cardiometabólico associado com diabetes tipo 2, obesidade e SM (Fruchart, 2009).

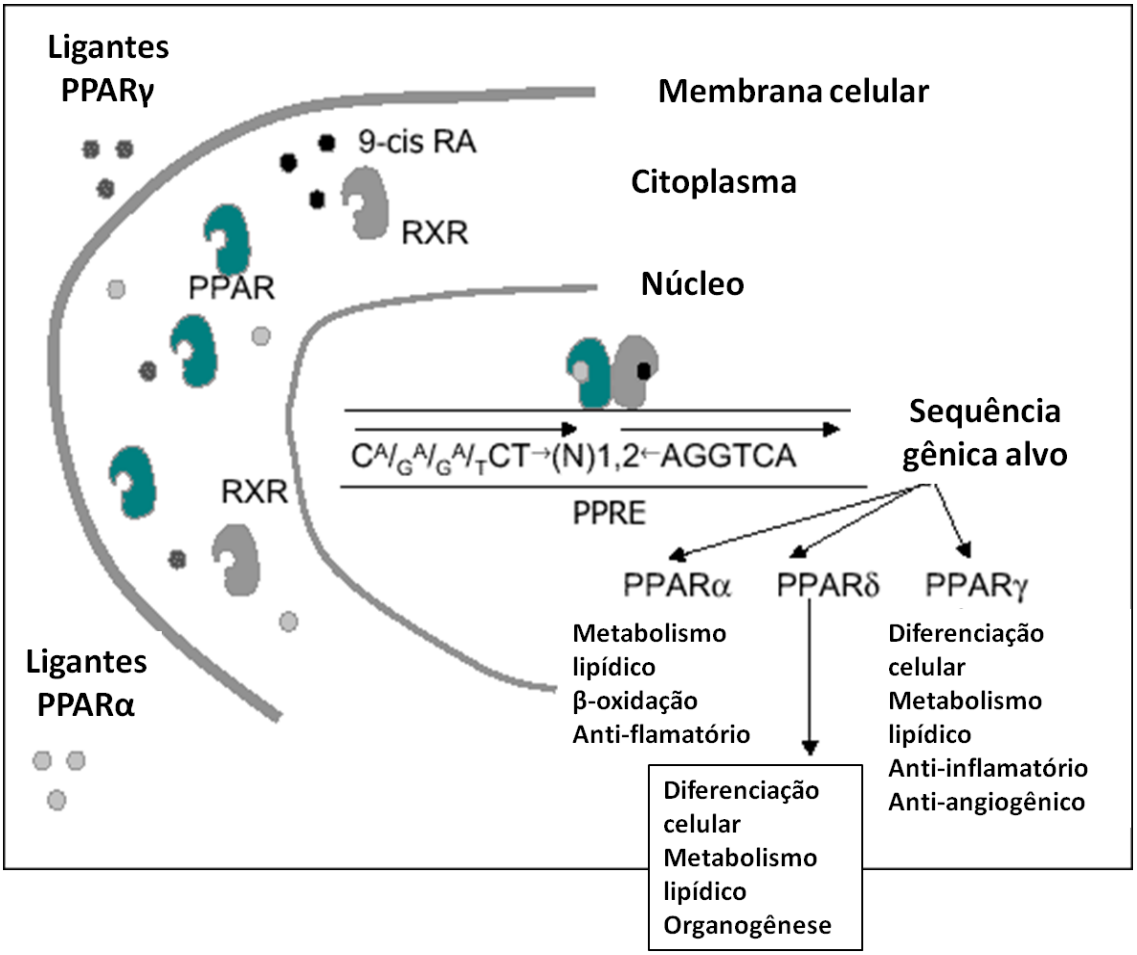


Figura 7 – Ativação do PPAR e transcrição gênica. Abreviações: PPAR, receptor ativador da proliferação peroxissomal; PPRE, elementos resposta PPAR; RXR, retinóide X para o ácido 9-*cis*-retinóico. Adaptada de Kiec-Wilk B, et al., *The selected pathophysiological aspects of PPARs activation.* J Physiol Pharmacol, 2005 **56**:149-62.

A ativação do PPAR-alfa provoca o aumento da expressão tecidual de genes-chaves envolvidos na captação e beta-oxidação de ácidos graxos. Estes incluem acil-CoA sintetase, uma enzima-chave na esterificação de ácidos graxos, prevenindo, assim, seus efluxos das células, no fígado e rins (Martin *et al.*, 1997), e CPT-1, uma enzima envolvida no catabolismo de ácidos graxos dentro da mitocôndria em tecidos ativos metabolicamente como o coração, músculo esquelético e tecido adiposo marrom. Com isso, ocorre a redução da síntese e liberação de VLDL e LDL (Chinetti-Gbaguidi *et al.*, 2005). A diminuição de TG ocorre por aumento da beta-oxidação de ácidos graxos, da lipase lipoproteica hepática (Schoonjans *et al.*, 1996), e da expressão da apoV, e diminuição da expressão de apoCIII (Staels *et al.*, 1995). Em adição, PPAR-alfa regula o metabolismo de HDL por vários mecanismos, incluindo a estimulação da expressão hepática de apoA-I e apoA-II, aumentando, assim, a produção hepática de HDL (Staels *et al.*, 1998).

A ativação do PPAR-alfa inibe a expressão de genes que codificam uma gama de proteínas da fase aguda e citocinas inflamatórias, como a IL-6, a proteína C-reativa (um complemento ativador e indutor da expressão de MCP-1), fibrinogênio e TNF-alfa (Marx *et al.*, 2002), o que implica em um efeito anti-inflamatório do PPAR-alfa. O controle da expressão dessas citocinas inflamatórias é exercida por interferência com as rotas inflamatórias NF-kB e AP-1 a nível transcricional (Delerive *et al.*, 1999; Delerive *et al.*, 2000). Assim, PPAR-alfa diminui IL-6 e TNF-alfa em pacientes com dislipidemia (Madej *et al.*, 1998). A repressão da inflamação por diminuição da liberação de citocinas é importante na modulação da cascata de respostas na aterosclerose. Adicionalmente, com a ativação do PPAR-alfa hepático ocorre a supressão de mediadores inflamatórios hepáticos incluindo TNF-alfa e reduz o acúmulo de gordura hepática durante o desenvolvimento da doença hepática gordurosa (Ip *et al.*, 2003), sugerindo um papel potencial na prevenção da esteatose e subsequente progressão para NAFLD.

PPAR-alfa também tem efeitos benéficos no sistema cardiovascular. Hipertensão arterial persistente aumenta o risco de anormalidade cardiovascular e estudos experimentais mostram que fenofibrato reduz a pressão arterial em ratos espontaneamente hipertensos e em ratos Dahl sal-sensíveis (Shatara *et al.*, 2000). Fenofibrato previne o dano cardíaco hipertensivo e a fibrose miocárdica por reduzir a expressão do gene inflamatório miocárdico mediado por NF-kB em ratos DOCA (deoxicorticosterona)-hipertensos (Ogata *et al.*, 2004). Além disso, fenofibrato previne fibrose cardíaca e anula a super-expressão do mRNA prepro-endotelina-1 no ventrículo esquerdo dos ratos DOCA-hipertensos (Iglarz *et al.*, 2003). Em adição,

fenofibrato previne o desenvolvimento da hipertensão arterial, inflamação miocárdica e fibrose nos ratos ANG II-infundidos por diminuir a expressão cardíaca de molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), molécula de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM), molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e TGF-beta, e a deposição de colágeno (Diep *et al.*, 2004).

A endotelina-1, um potente peptídeo vasoconstritor, está aumentado no coração hipertrofiado, o qual está acompanhado com o desenvolvimento de fibrose cardíaca. O tratamento com fenofibrato atenua o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca em ratos com aumento da pressão arterial por estenose aórtica por reduzir a expressão de mRNA endotelina-1, expressão de mRNA colágeno tipo I e III e fibrose intersticial e perivascular (Ogata *et al.*, 2002).

3. **MATERIAL E MÉTODOS**

3. 1. **Animais e tratamento**

Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com as diretrizes convencionais do "*Care and Use of Laboratory Animals*" (US National Institutes of Health, revisado em 1996). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê para Uso e Cuidado de Animais de Laboratório da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil (protocolo número CEA/221/2008).

Foram utilizados 24 camundongos C57Bl/6 machos com três meses de idade, mantidos em condições controladas de luz (12-12h claro/escuro), temperatura (21-23ºC) e umidade (60-70%), e com livre acesso à comida e água filtrada. Inicialmente, os animais foram divididos randomicamente em dois grandes grupos e alimentados com uma das duas dietas a seguir por um período de 11 semanas:

a. Dieta controle (grupo C, 3,57 kcal/g de dieta, 12 animais);
b. Dieta hiperlipídica (grupo HL, 5,40 kcal/g de dieta, 12 animais).

A dieta controle consistiu de 76% de calorias provenientes de carboidratos, 10% de lipídios, e 14% de proteínas, e a dieta hiperlipídica consistiu de 26% de calorias provenientes de carboidratos, 60% de lipídios, e 14% de proteínas. O conteúdo mineral e de vitaminas de ambas as dietas foi idêntico e seguiu o preconizado pelo *American Institute of Nutrition's* - AIN93 (Reeves *et al.*, 1993) (Tabela 2).

Após 11 semanas, os animais foram mais uma vez subdivididos randomicamente em quatro grupos, com seis animais cada, por mais cinco semanas (da semana 11 até a semana 16), de acordo com o tratamento farmacológico que receberam:

- Grupo C não tratado;
- Grupo HL não tratado;
- Grupo C-F (animais C tratados com fenofibrato);
- Grupo HL-F (animais HL tratados com fenofibrato).

Fenofibrato foi administrado na dose de 150 mg/kg por gavagem orogástrica toda manhã (8:00h).

3. 2. **Massa corporal e ingestão energética**

A massa corporal foi avaliada semanalmente (segunda-feira, 8:00h) para o ajuste da ingestão da droga em uma balança digital (Marte A-1500; precisão 0,01g). A ingestão diária de energia por camundongo foi calculada multiplicando-se a ingestão diária de comida (8:00h) pela energia da dieta (kJ/g de dieta).

3.3. **Pressão arterial**

Durante as cinco semanas de administração da droga, a pressão arterial foi aferida semanalmente (sexta-feira, 8:00h) pelo método não invasivo da pletismografia da artéria da cauda em animais conscientes (Letica LE 5100, Panlab, Barcelona, Spain). Porém, antes da administração da droga e aferição da pressão arterial, os animais passaram por duas semanas de adaptação para o método.

Tabela 2 – Composição das dietas controle (C) e hiperlipídica (HL).

Ingredientes (g/Kg)	Dieta	
	C	HL
Caseína (≥ 85% de proteína)	140,0	190,0
Maisena	620,692	250,692
Sacarose	100,0	100,0
Óleo de soja	40,0	40,0
Banha de porco	-	320,0
Fibra	50,0	50,0
Mistura de vitaminas*	10,0	10,0
Mistura de minerais**	35,0	35,0
Cistina	1,8	1,8
Colina	2,5	2,5
Antioxidante	0,008	0,008
Total em gramas	1.000,0	1.000,0
Energia (Kcal/Kg)	3573	5404
Hidratos de carbono (%)	76	26
Proteínas (%)	14	14
Lipídios (%)	10	60

Mistura de vitaminas* e de minerais** segundo recomendação da AIN-93M (Reeves *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1999).

3. 4. **Metabolismo de carboidratos**

3.4.1. Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)

O TOTG foi realizado no final do experimento (semana 16) para avaliar a tolerância à glicose. Para o TOTG, glicose a 25% em salina estéril (NaCl a 0,9%) foi administrada por gavagem orogástrica após um período de seis horas de jejum (1g de glicose/kg de peso corporal). Para o teste, o sangue foi obtido por uma pequena incisão na ponta da cauda do animal e a glicemia foi medida com o auxílio de um glicosímetro (Accu-Check Performa, Roche, Brasil) primeiramente antes da glicose e aos 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração de glicose. A análise da resposta à glicose no TOTG foi baseada na área sob a curva (ASC), calculada usando a régua trapezoidal (GraphPad Prism version 5.03, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3.4.2. Teste intraperitoneal de tolerância à insulina (TITI)

O TITI foi realizado no final do experimento (semana 16) para avaliar a tolerância à insulina. O TITI foi feito após um período de quatro horas de jejum usando uma dose de 1 UI/kg de insulina i.p. (Humalog insulin lispro, Eli Lilly, Indianapolis USA). O sangue foi obtido por uma pequena incisão na ponta da cauda do animal e a glicemia foi medida com o auxílio de um glicosímetro (Accu-Check, Performa, Roche, Brasil) primeiramente antes da injeção com insulina e aos 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração de insulina. A análise da resposta à glicose no TITI foi baseada na ASC, calculada usando a régua trapezoidal (GraphPad Prism version 5.03, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3.5. **Eutanásia**

Ao final do experimento os animais foram deixados em jejum durante seis horas (mas com livre acesso à água) e, então, foram profundamente anestesiados (sodium pentobarbital, 150 mg/kg i.p.). A cavidade torácica foi imediatamente aberta e amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca através do átrio direito para análises bioquímicas. O sangue foi centrifugado a 120xg por 15 minutos em temperatura ambiente e o plasma aliquotado e armazenado a –20ºC e –80ºC até ser analisado.

O coração foi dissecado e lavado em solução fisiológica até a remoção completa do sangue e, então, o ventrículo esquerdo foi isolado e pesado (incluindo o septo interventricular). Uma parte do ventrículo esquerdo foi armazenada a –80ºC para análises por *Western blotting*. Outra parte do ventrículo esquerdo foi armazenada em solução fixadora por 48 horas (preparada na hora com formaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M e pH de 7,2).

A cavidade abdominal também foi aberta e exposta e o fígado e a gordura epididimária foram cuidadosamente dissecados e pesados. Amostras randomizadas foram rapidamente obtidas de todas as regiões do fígado e da gordura epididimária, e, então, fixadas na mesma solução fixadora antes descrita por 48 h em temperatura ambiente.

3.6. **Metabolismo de lipídios – Análises bioquímicas**

Alíquotas do plasma sanguíneo armazenados a –20ºC foram utilizadas para as análises bioquímicas. Colesterol total (CT) sanguíneo, TG e HDL foram dosados por método enzimático colorimétrico (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil).

3.7. **Análise Milliplex**

A insulina sérica foi dosada por *Milliplex Map Immunoassay* (Millipore, Billerica, MA, USA, cat. no. MADPK-71K). A razão insulina/glicose (I/G) foi calculada para avaliar e comparar a resistência insulínica nos animais.

3.8. **Estereologia do miocárdio**

O ventrículo esquerdo foi incluído em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), então, secções com 5 µm de espessura foram cortadas e coradas com hematoxilina e eosina e picro Sirius red e imagens digitais foram obtidas com um sistema consistindo de um microscópio Leica DMRBE (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) e uma câmera digital (Infinity 1-5c, Lumenera Co., Otawa, ON, Canada). A espessura média do ventrículo esquerdo foi determinada com quatro medidas por imagem obtidas em 0, 90, 180 e 270º e analisadas com o software Image Pro Plus (versão 7.01, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

A densidade de volume (Vv) dos cardiomiócitos (cmi) e dos capilares intramiocárdicos (cap) foi estimada por contagem de pontos com um sistema-teste composto por 36 pontos-testes em pelo menos dez campos por animal, por ex. 36 x 10 x 6 = 2160 pontos-teste por grupo. Considerando que a menor Vv obtida foi de 8,0%, o desenho estereológico para estimar a Vv segue um erro padrão aceitável calculado de 0,049 ou $P<0,05$, baseado na equação $P_T = 0,453 * (1 - Vv) / (Vv * E2)$[1]. O sistema-teste foi produzido com o sistema baseado na web pelo STEPanizer[2] (Figura 8) (Tschanz *et al.*, 2011). A área seccional média do cardiomiócito (A[cmi]) foi estimada como Vv[cmi]/2.Q_A[ncmi] (µm^2) sendo Q_A[ncmi] = N[ncmi]/A_T (N[ncmi] é o número de perfis de núcleos de cmi contados na área-teste, A_T) (Mandarim-de-Lacerda, 2003). Duas linhas consecutivas da área-teste foram consideradas

[1] (http://www.ou.edu/research/electron/bmz5364/calc-stereology.html)
[2] (www.stepanizer.com)

como “linhas proibidas” para evitar superestimação (Gundersen, 1977). A razão Vv[cmi]/Vv[cap] foi usada para avaliar a vascularização intramiocárdica.

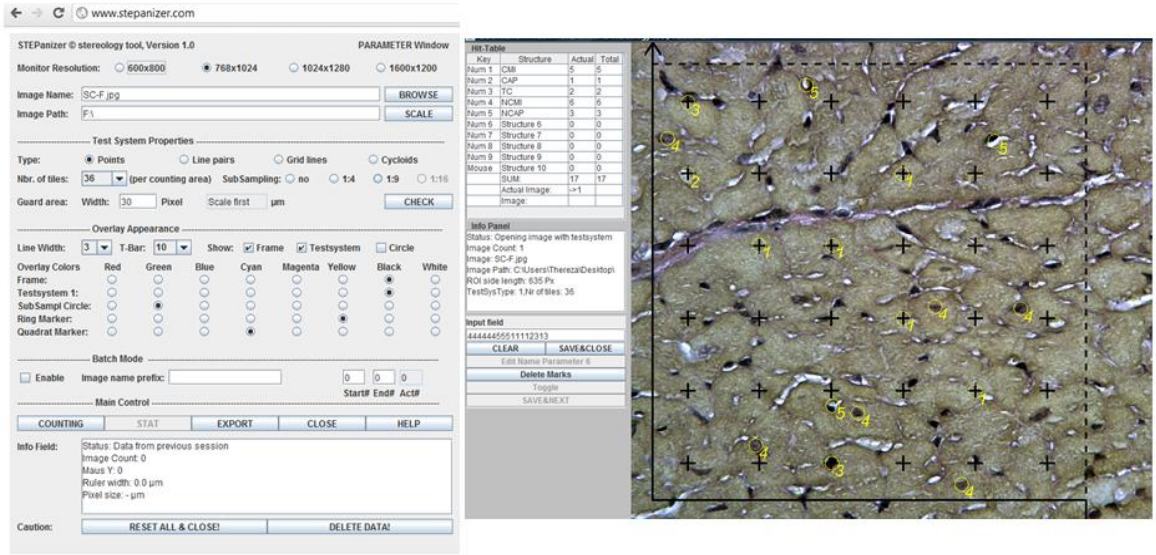


Figura 8 – Estereologia do ventrículo esquerdo. A densidade de volume (Vv) dos cardiomiócitos (cmi) e dos capilares intramiocárdicos (cap) foi estimada por contagem de pontos com um sistema-teste composto por 36 pontos-testes, e o número de perfis de núcleos de cmi contados na área-teste, A_T. O sistema-teste foi produzido com o sistema baseado na web pelo STEPanizer (www.stepanizer.com) e imagens digitais adquiridas para a análise.

3.9. *Western blotting* para ANG II, AT1R e AT2R

As proteínas do ventrículo esquerdo foram extraídas utilizando tampão gelado para homogeneização contendo inibidores de proteases (cloreto de sódio a 150 mM, NP-40 a 1,0%, Tris a 50 mM, pH 8,0, 1 µg/ml de coquetel de inibidor de protease, Sigma-Aldrich, MO, USA). Os homogenatos resultantes foram centrifugados a 8640xg duas vezes por 15 min a 4ºC, os infranadantes aliquotados e armazenados a –80º C até serem usados. Amostras contendo 10 µg/ml de proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS a 10%. Marcadores coloridos (BIO-RAD, Hercules, USA) foram usados como

marcadores de pesos moleculares. As proteínas foram, então, transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF; Amersham Biosciences, PiCataway, NJ, USA), que foram incubadas em leite desnatado em pó a 5% (wt/vol) dissolvido em T-TBS (contendo Tris-HCL a 20 mM com pH 7,5, NaCl a 0,5 mM, Tween 20 a 0,05%) por 1,5 hora em temperatura ambiente para o bloqueio de sítios de ligações. Em seguida, a membrana foi incubada com um dos seguintes anticorpos: anticorpo policlonal para angiotensina II anti-mouse (Abcam, CA, USA), anticorpo policlonal para AT1R anti-mouse (Santa Cruz, CA, USA), anticorpo policlonal para AT2R (Santa Cruz, CA, USA), e anticorpo monoclonal para beta-actina anti-mouse (Santa Cruz, CA, USA) em T-TBS *overnight* a 4ºC. O anticorpo monoclonal para beta-actina anti-mouse foi usado para corrigir os valores. Após lavagem intensa em T-TBS, as membranas foram incubadas por uma hora em temperatura ambiente com anticorpo secundário acoplado a peroxidase anti-goat ou anti-mouse em T-TBS, de acordo com a especificação do anticorpo primário. A membrana foi, então, incubada com reagente de detecção de quimioluminescência aumentada (ECL, Amersham BioCiences, PiCataway, NJ, USA) e exposto a um filme de raio-x. A análise densiométrica das imunomarcações foi realizada através do software Image Pro Plus (versão 7.01, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

3.10. **Morfometria do adipócito**

Fragmentos randomizados da gordura epididimária passaram pelos processos histológicos de rotina para a microscopia de luz, foram incluídos em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), seccionados a 5 µm de espessura e corados em hematoxilina e eosina. Imagens digitais aleatórias dos cortes da gordura epididimária foram adquiridas (microscópio Leica DMRBE, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany, e câmera digital Infinity 1-5c, Lumenera Co., Otawa, ON, Canada). A média do diâmetro do adipócito foi medida usando o software Image Pro Plus (versão 7.01, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) (Figura 9). Ao menos 50 adipócitos foram analisados por camundongo, totalizando 300 adipócitos por grupo (Fernandes-Santos *et al.*, 2009; Frantz *et al.*, 2011).

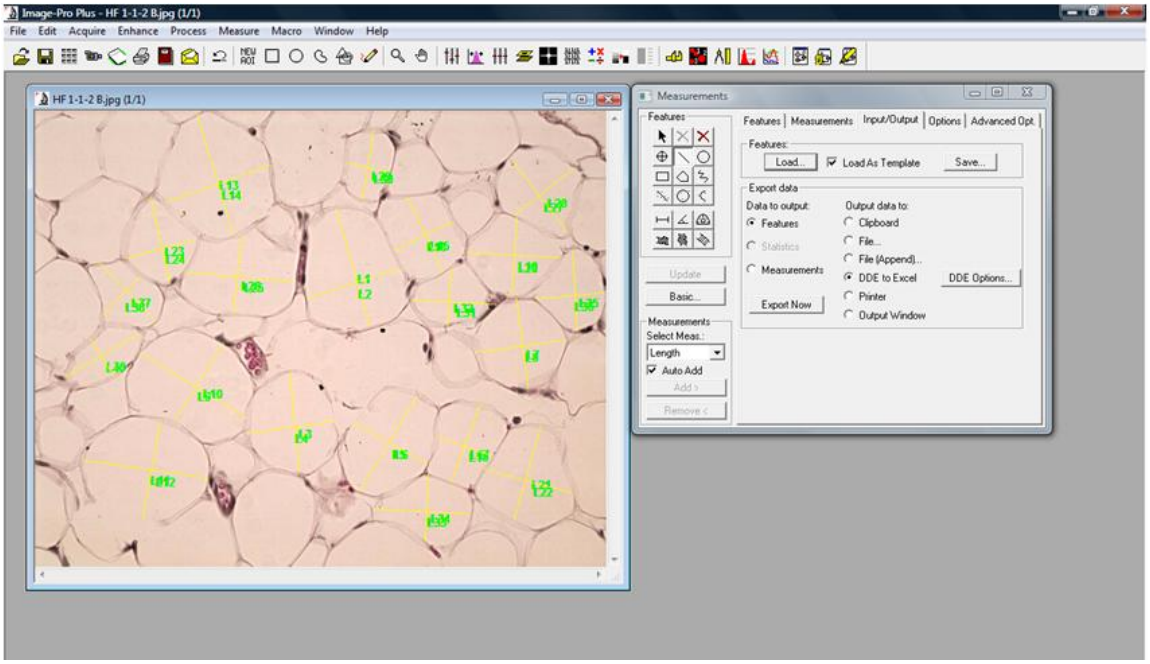


Figura 9 – Morfometria do adipócito. Imagens digitais foram adquiridas e a média do diâmetro do adipócito foi medida usando o software Image Pro Plus (versão 7.01, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA)

3.11. **Esteatose hepática**

Fragmentos randomizados do fígado passaram pelos processos histológicos de rotina para a microscopia de luz, foram incluídos em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), seccionados a 5 µm de espessura e corados em hematoxilina e eosina. Cortes não consecutivos do fígado foram obtidos e cinco campos aleatórios por animal foram analisados. O Vv da esteatose hepática foi estimada por contagem de pontos como descrito previamente.

3.12. **Análise dos dados**

Os dados são mostrados como média e erro padrão da média. Os dados foram testados para a normalidade e homogeneidade de variâncias, e, então, as diferenças entre os grupos foram testadas por one-way ANOVA e pós-teste de Tukey. O teste *t* de Student foi usado para comparar dados entre os grupos C e HL até a semana 11 (Prism versão 5.03, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Para todas as análises, um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significante.

4. **RESULTADOS**

4.1. **Ingestão alimentar e de energia, massa corporal, e pressão arterial**

Os animais HL ingeriram menos comida que os animais C (33% a menos; ANOVA, $P<0{,}0001$), e o tratamento com fenofibrato não alterou a ingestão alimentar (Tabela 3). Por outro lado, os animais HL tiveram uma ingestão de energia maior (17% maior que os animais C; ANOVA, $P<0{,}0001$), e, mais uma vez, fenofibrato não teve efeito comparando os grupos HL e C (Tabela 3).

Após 11 semanas de dieta, o grupo HL foi 17% mais pesado que o grupo C (ANOVA, $P<0{,}001$). A massa corporal do grupo HL-F foi reduzida e, após três semanas de tratamento (semana 14), alcançou valores semelhantes aos do grupo C. Ao final do experimento (semana 16), os animais HL-F tiveram uma massa corporal 18% menor que os animais HL (ANOVA, $P<0{,}001$) (Figura 10). Em adição, fenofibrato não alterou a massa corporal nos animais alimentados com a dieta controle (grupo C-F).

A ingestão da dieta HL resultou na elevação da pressão arterial no grupo HL. Ao final do experimento (semana 16), os animais HL mostraram uma pressão arterial 12% maior que os animais C (ANOVA, $P<0{,}001$). Fenofibrato foi eficiente em reduzir em 7% a pressão arterial nos animais HL-F em comparação com os animais HL não tratados (ANOVA, $P<0{,}05$) (Figura 11).

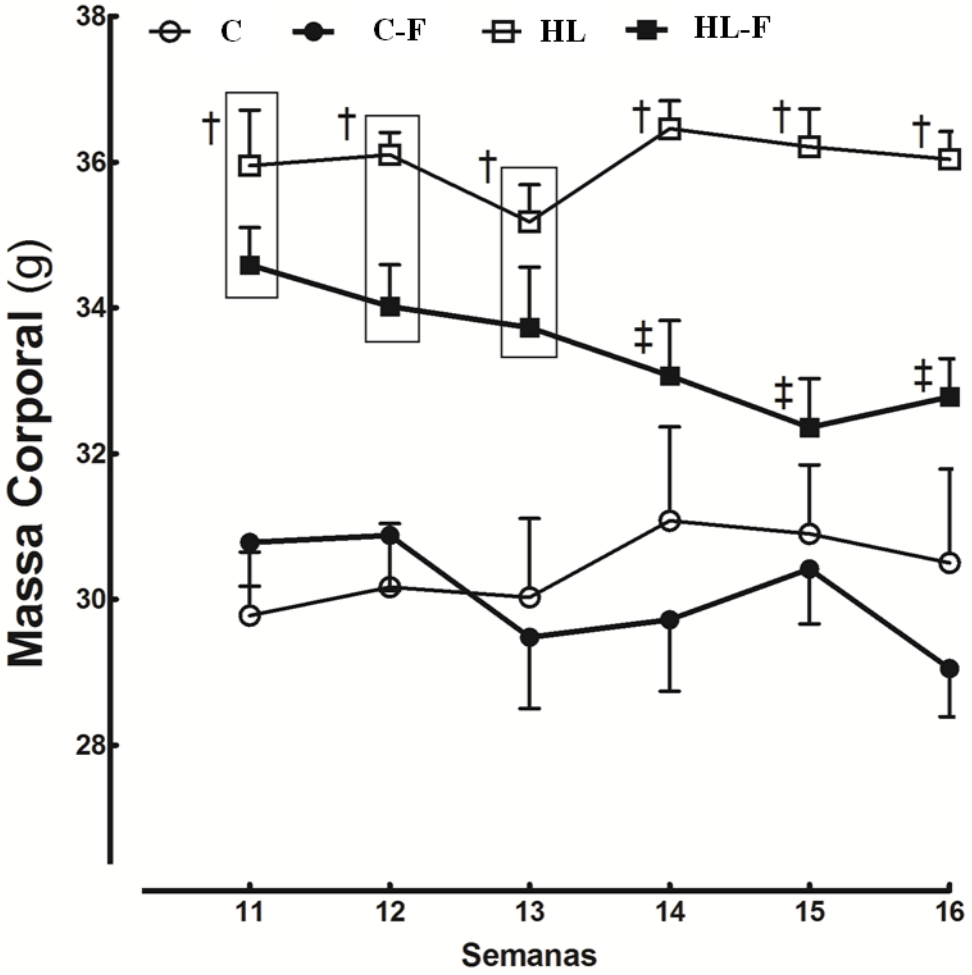


Figura 10 – Evolução da massa corporal (média e erro padrão da média, n = 6 animais em cada grupo). Abreviações: C, dieta controle; C-S, dieta controle mais fenofibrato; HL, dieta hiperlipídica; HL-F, dieta hiperlipídica mais fenofibrato. One-way ANOVA e pós-teste de Tukey: quando comparados, $P<0,05$; se: † quando comparado com C, ‡ com HL.

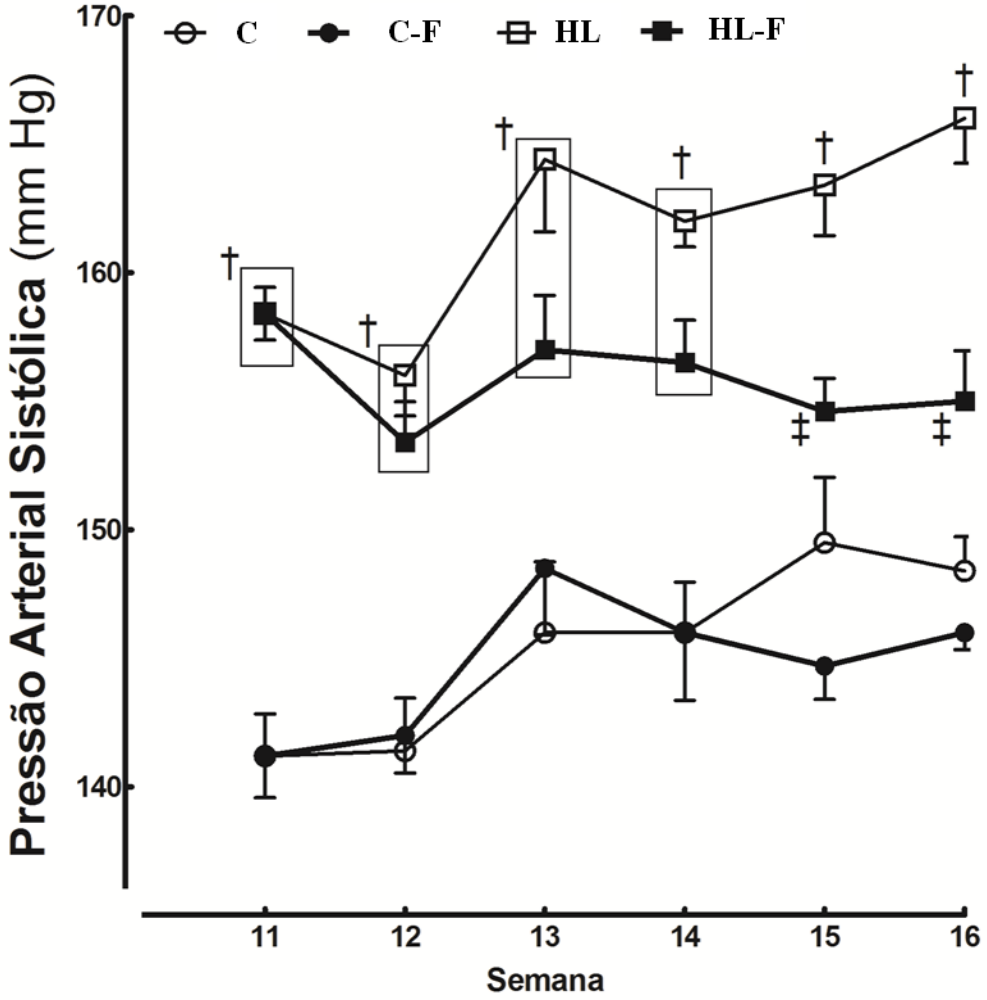


Figura 11 – Pressão arterial sistólica (média e erro padrão da média, n = 6 animais em cada grupo). Abreviações: C, dieta controle; C-S, dieta controle mais fenofibrato; HL, dieta hiperlipídica; HL-F, dieta hiperlipídica mais fenofibrato. Note que a administração de fenofibrato reduziu a pressão arterial sistólica desde o começo do tratamento. Nas semanas 15 e 16, o grupo HL-F foi diferente do grupo HL e semelhante ao grupo C. One-way ANOVA e pós-teste de Tukey: quando comparados, $P<0,05$; se: † quando comparado com C, ‡ com HL.

4.2. **Metabolismo de carboidratos**

A dieta HL aumentou a glicemia de jejum nos animais HL (aumento de 25% quando comparada a dos animais C; ANOVA, $P<0,01$), mas o tratamento com fenofibrato não foi eficiente em reduzir esta glicemia (Tabela 3). A dieta HL também resultou em intolerância à glicose, avaliada pela ASC do TOTG (Figura 12). Ela foi 34% maior nos animais HL que nos animais C (ANOVA, $P<0,0001$), porém fenofibrato foi hábil em reduzir em 5% a ASC do TOTG (ANOVA, $P<0,0001$) nos animais HL-F quando comparada ao do grupo HL. Inexplicavelmente, a administração de fenofibrato no grupo C-F provocou um aumento na ASC do TOTG (14% maior que no grupo C; ANOVA, $P<0,001$).

Os níveis de insulina também foram aumentados nos animais HL comparados com os animais C (aumento de 35%; ANOVA, $P<0,0001$). Após o tratamento com fenofibrato, os níveis de insulina nos animais HL-F foram próximos daqueles dos animais C (com uma redução de 22% comparados com os animais HL; ANOVA, $P<0,0001$) (Tabela 3). A tolerância à insulina foi avaliada pela ASC do TITI (Figura 13) e os animais HL mostraram uma ASC maior que os animais C (31% maior; ANOVA, $P<0,0001$), enquanto que a administração de fenofibrato reduziu em 24% a ASC do TITI nos animais HL-F comparados com os animais HL (ANOVA, $P<0,0001$), com valores próximos daqueles dos animais C. A razão I/G diminuiu 38% dos animais C para os animais C-F (ANOVA, $P<0,001$) e aumentou 26% dos animais C para os animais HL (ANOVA, $P<0,001$). Mais uma vez, fenofibrato reduziu a razão I/G em 34% dos animais HL para os animais HL-F (ANOVA, $P<0,001$) (Tabela 3). Esses dados mostram uma melhora da resistência à insulina com o tratamento com fenofibrato nos animais HL-F.

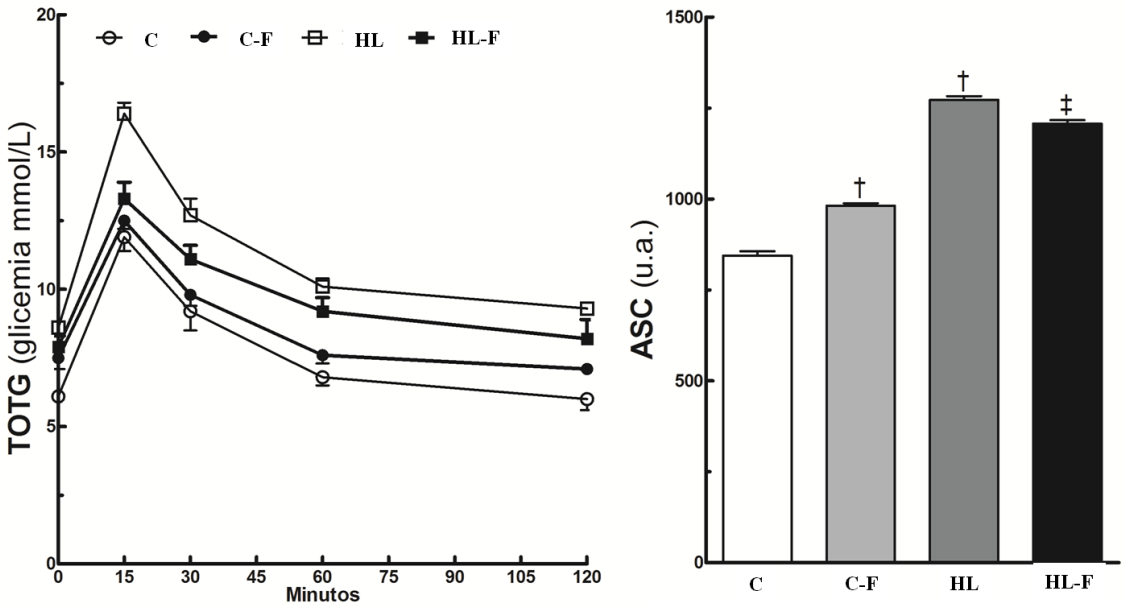


Figura 12 – Curva do teste oral de tolerância à glicose (TOTG). A área sob a curva (ASC) mostra significativas diferenças entre os grupos (média e erro padrão da média, n = 6 animais em cada grupo). Abreviações: C, dieta controle; C-S, dieta controle mais fenofibrato; HL, dieta hiperlipídica; HL-F, dieta hiperlipídica mais fenofibrato. One-way ANOVA e pós-teste de Tukey: quando comparados, $P<0,05$; se: † quando comparado com C, ‡ com HL.

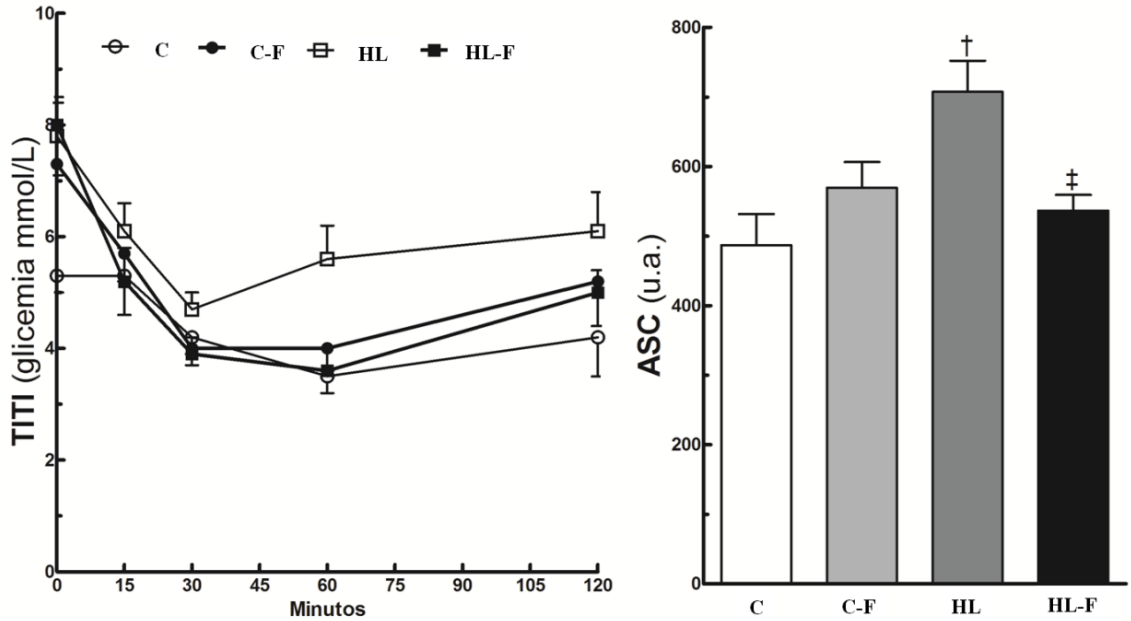


Figura 13 – Curva do teste intraperitoneal de tolerância à insulina (TITI). A área sob a curva (ASC) mostra significativas diferenças entre os grupos (média e erro padrão da média, n = 6 animais em cada grupo). Abreviações: C, dieta controle; C-S, dieta controle mais fenofibrato; HL, dieta hiperlipídica; HL-F, dieta hiperlipídica mais fenofibrato. One-way ANOVA e pós-teste de Tukey: quando comparados, $P<0,05$; se: † quando comparado com C, ‡ com HL.

4.3. **Metabolismo de lipídios**

Os dados são mostrados na Tabela 3. Os lipídios sanguíneos aumentaram após 16 semanas de dieta HL. CT foi 36% maior nos animais HL que nos animais C (ANOVA, $P<0,0001$), mas a administração de fenofibrato foi eficiente em reduzir em 21% o CT nos animais HL-F em relação aos animais HL não tratados (ANOVA, $P<0,001$). O grupo HL teve os níveis de TG 23% maiores que o grupo C (ANOVA, $P<0,001$), e o fenofibrato mais uma vez foi eficiente em reduzir em 31% os TG nos animais HL-F (ANOVA, $P<0,0001$), que mostraram valores próximos daqueles dos animais C. O HDL foi menor nos animais HL que nos animais C (30% menor; ANOVA, $P<0,0001$). Fenofibrato foi eficiente em aumentar o HDL em 24% nos animais HL-F em relação aos animais HL (ANOVA, $P<0,001$). Porém, fenofibrato não alterou os lipídios sanguíneos no grupo C-F em relação aos do grupo C não tratado.

4.4 **Ventrículo esquerdo**

Os animais HL tiveram a massa do ventrículo esquerdo maior que os animais C (16% maior; ANOVA, $P<0,001$). O tratamento com fenofibrato reduziu a massa do ventrículo esquerdo nos animais HL-F em comparação ao dos animais HL (redução de 20%; ANOVA, $P<0,001$), mas com nenhuma diferença em comparação ao dos animais C (Tabela 3). A espessura do ventrículo esquerdo também foi maior nos animais HL quando comparada com a dos animais C (12% maior; ANOVA, $P<0,001$), e, mais uma vez, fenofibrato reduziu este parâmetro nos animais HL-F (redução de 18% quando comparada a dos animais HL; ANOVA, $P<0,001$), que mostrou valores próximos daqueles dos animais C (Figura 14 e Tabela 3).

A A[cmi] foi maior após 16 semanas com dieta HL (aumento de 26% comparada com a do grupo C; ANOVA, $P<0,0001$), e o tratamento com fenofibrato foi eficiente em atenuar a hipertrofia do cardiomiócito nos animais HL-F, que tiveram uma redução de 14% quando comparados com os animais HL (ANOVA, $P<0,0001$), por ex. os valores foram próximos

daqueles dos animais C (Figura 15). A densidade de capilares intramiocárdicos foi reduzida nos animais HL (redução de 61% comparada com a dos animais C; ANOVA, $P<0,0001$), e o tratamento com fenofibrato foi capaz de melhorar a vascularização miocárdica em 36% nos animais HL-F em relação aos animais HL não tratados (ANOVA, $P<0,001$) (Figura 16). A Figura 17 mostra a aparência do miocárdio em todos os grupos do presente estudo, delineando o contorno de um cardiomiócito típico em cada grupo, bem como os capilares intramiocárdicos.

Tabela 3 – Consumo alimentar e energético, metabolismo de carboidratos e lipídios, biometria da gordura epididimária, fígado, e ventrículo esquerdo. Dados expressos em média±EPM. One way ANOVA e pós-teste de Tukey: nos casos sinalizados, quando comparados, $P<0,05$; se: † quando comparado com C, ‡ com HL.

Parâmetros	Grupos			
	C	C-F	HL	HL-F
Dieta (g/dia/animal)	3,5 ± 0,2	3,5 ± 0,1	2,8 ± 0,1†	2,7 ± 0,1†
Energia (kJ/dia/animal)	52,4 ± 2,2	52,2 ± 1,6	62,7 ± 0,7†	61,5 ± 2,4†
Glicemia de jejum (mmol/L)	6,1 ± 0,3	6,9 ± 0,3	8,1 ± 0,3†	8,6 ± 0,2†
Insulina (µUI/ml)	24,1 ± 1,1	18,3 ± 1,3	37,6 ± 1,2†	29,3 ± 2,5‡
I/G (UI/mol)	4,00 ± 0,26	2,48 ± 0,25†	5,04 ± 0,18†	3,32 ± 0,23‡
Colesterol total (mg/dL)	126,2 ± 5,0	141,8 ± 3,1	197,0 ± 4,2†	155,7 ± 3,3†‡
Triglicerídeos (mg/dL)	33,8 ± 2,1	31,2 ± 1,9	43,8 ± 2,5†	30,1 ± 1,7‡
HDL (mg/dL)	35,0 ± 2,6	31,8 ± 1,9	24,5 ± 1,3†	32,3 ± 1,0‡
Ventrículo esq. (mg)	88,5 ± 6,2	82,0 ± 1,7	105,0 ± 4,5†	83,6 ± 2,2‡
Espessura do ventrículo esq. (mm)	1,47 ± 0,02	1,38 ± 0,06	1,72 ± 0,05†	1,40 ± 0,03‡
Gordura epididimária (mg)	145 ± 25,5	108 ± 18,7	293 ± 24,7†	187 ± 15,6‡
Fígado (mg)	2,5 ± 0,1	1,8 ± 0,1†	3,1 ± 0,1†	1,7 ± 0,1†‡

Dados expressos em média±EPM. One way ANOVA e pós-teste de Tukey: nos casos sinalizados, quando comparados, $P<0,05$; se: † quando comparado com C, ‡ com HL.

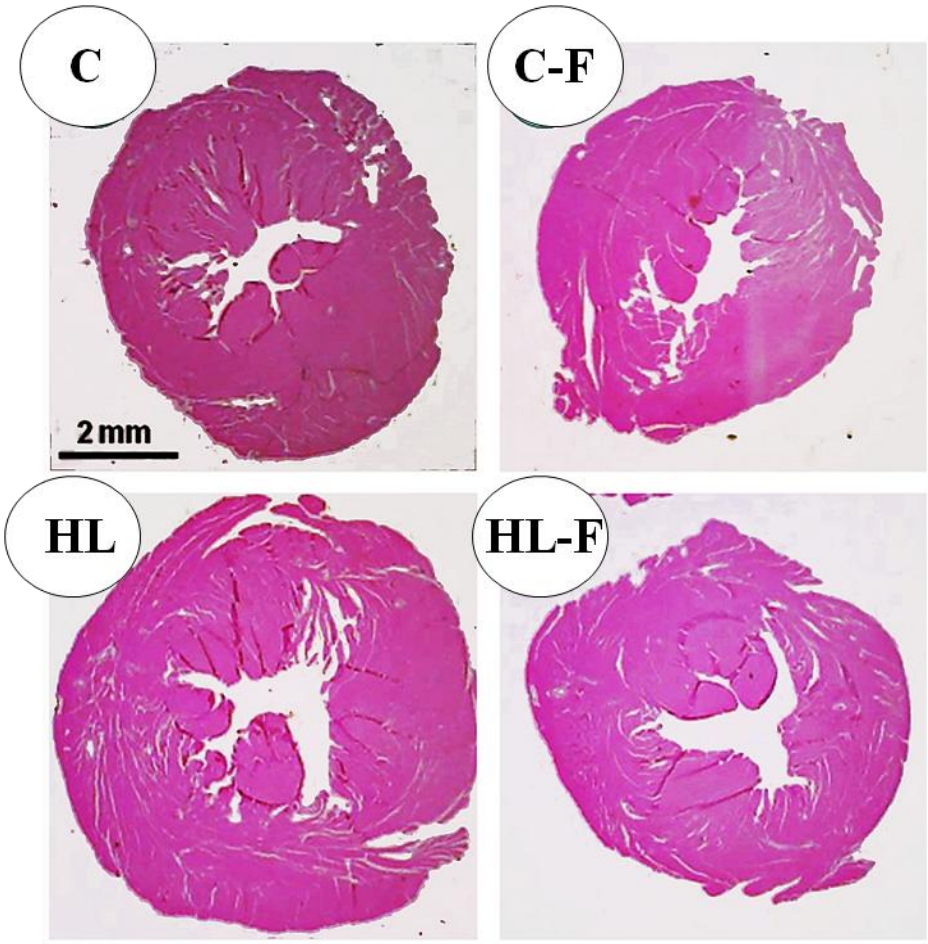


Figura 14 – Cortes transversais do ventrículo esquerdo ao nível dos músculos papilares para medir a espessura ventricular. Abreviações: C, dieta controle; C-S, dieta controle mais fenofibrato; HL, dieta hiperlipídica; HL-F, dieta hiperlipídica mais fenofibrato. A espessura da parede livre do ventrículo esquerdo foi maior nos animais HL quando comparada com a dos animais C (1,7±0,05 mm *vs.*1,5±0,02 mm, 12% maior; ANOVA, $P<0,001$).

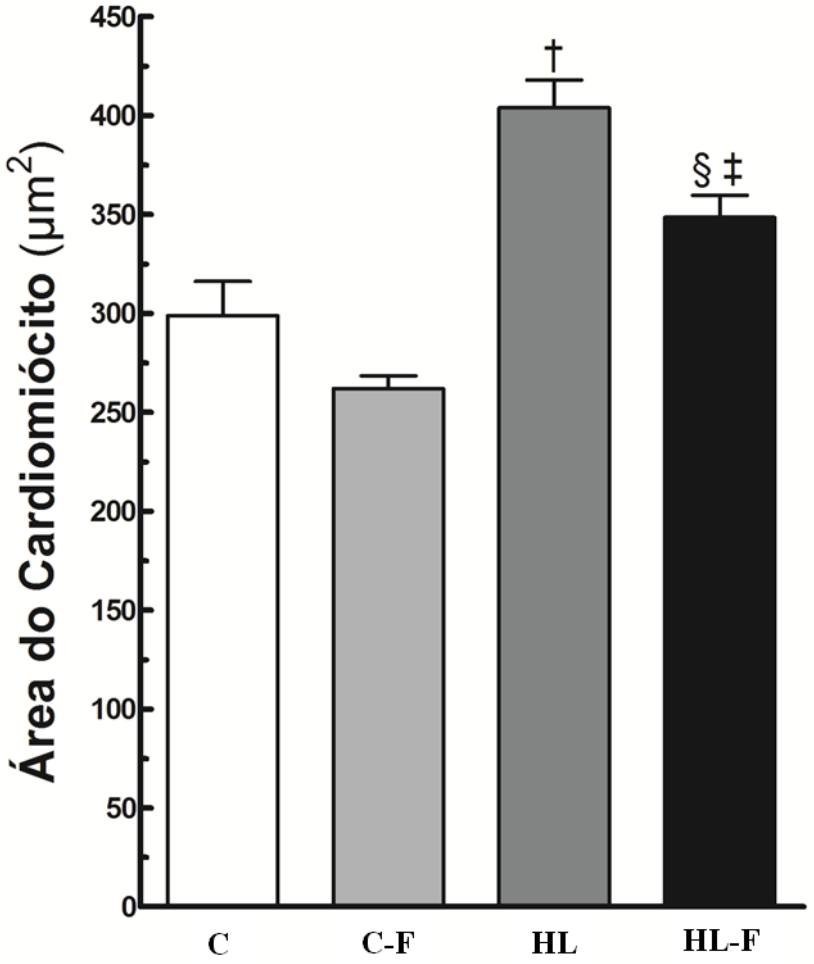


Figura 15 – Área seccional média do cardiomiócito (média e erro padrão da média, n = 6 animais em cada grupo). Abreviações: C, dieta controle; C-S, dieta controle mais fenofibrato; HL, dieta hiperlipídica; HL-F, dieta hiperlipídica mais fenofibrato. One-way ANOVA e pós-teste de Tukey: quando comparados, $P<0,05$; se: † quando comparado com C, § com C-S, ‡ com HL.

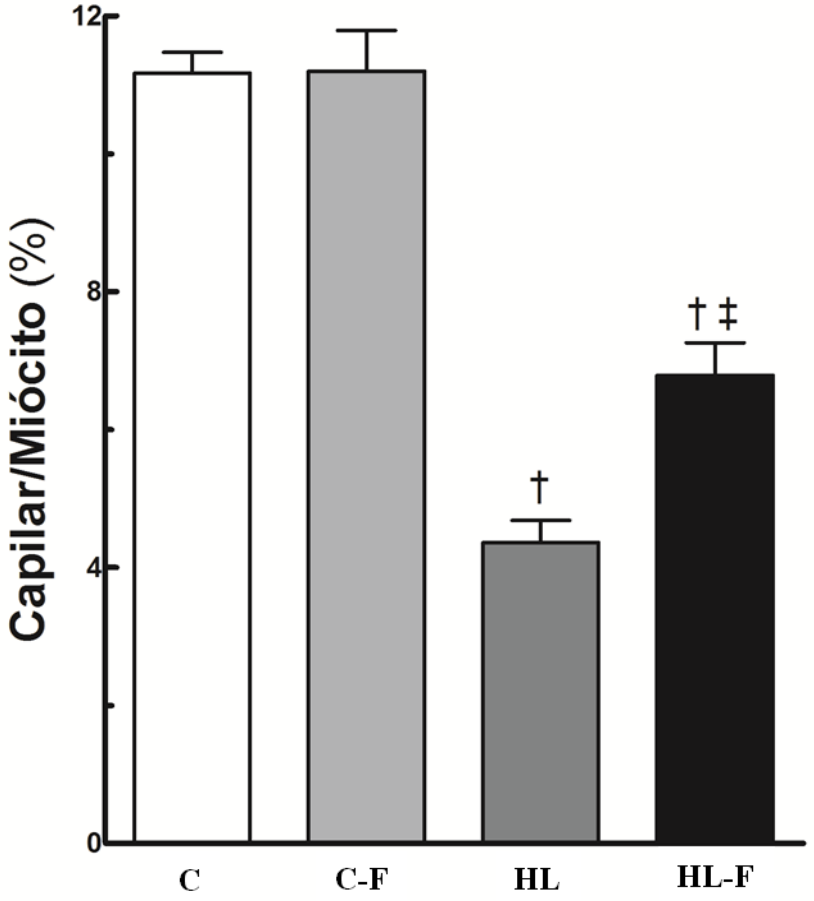


Figura 16 – Razão entre a densidade de volume dos capilares intramiocárdicos e o cardiomiócito. Abreviações: C, dieta controle; C-S, dieta controle mais fenofibrato; HL, dieta hiperlipídica; HL-F, dieta hiperlipídica mais fenofibrato. One-way ANOVA e pós-teste de Tukey: quando comparados, $P<0,05$; se: † quando comparado com C, ‡ com HL.

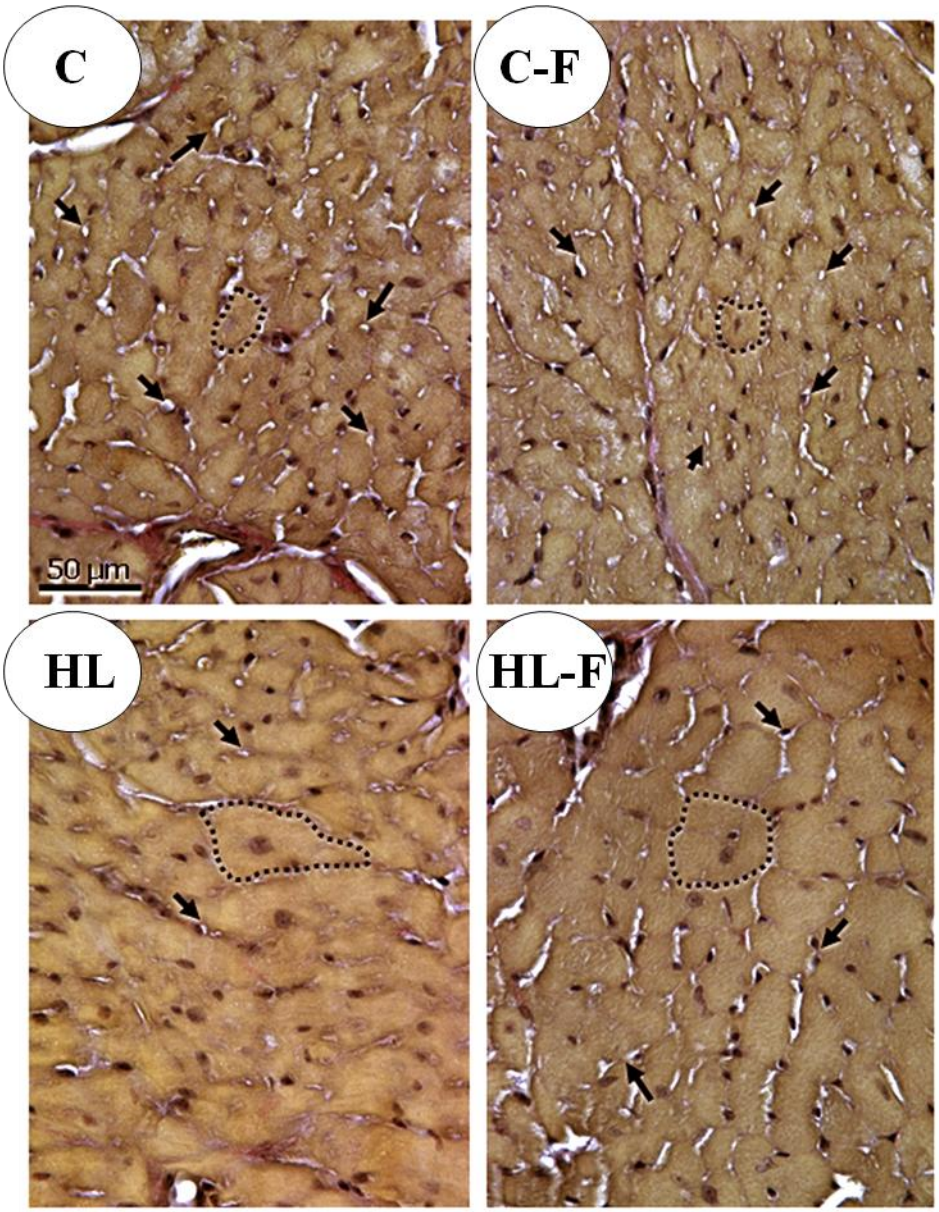


Figura 17 – Fotomicrografias do miocárdio (corado com picro Sirius red em todos os grupos) em todos os grupos mostrando cardiomiócitos e capilares. Em cada grupo, um cardiomiócito típico foi circulado (linha pontilhada) e alguns exemplos de capilares foram indicados (setas). Abreviações: C, dieta controle; C-S, dieta controle mais fenofibrato; HL, dieta hiperlipídica; HL-F, dieta hiperlipídica mais fenofibrato.

4.5. *Western blotting* para ANG II, AT1R e AT2R

A expressão proteica de ANG II foi 33% maior nos animais HL que nos animais C (ANOVA, $P<0,0001$). Fenofibrato foi eficiente em reduzir em 13% a expressão proteica de ANG II no grupo HL-F em comparação ao do grupo HL (ANOVA, $P<0,0001$). Fenofibrato aumentou a expressão de ANG II em 11% no grupo C-F em comparação com a do grupo C (ANOVA, $P<0,0001$) (Figura 18). A expressão proteica de AT1R foi 43% maior no grupo HL que no grupo C (ANOVA, $P<0,0001$), e foi reduzida pelo tratamento com fenofibrato em 27% no grupo HL-F comparada com a do grupo HL (ANOVA, $P<0,0001$). O grupo C-F também mostrou uma expressão 17% maior de AT1R que a do grupo C (ANOVA, $P<0,0001$) (Figura 19). A expressão proteica de AT2R foi reduzida em 15% nos animais HL comparada a dos animais C (ANOVA, $P<0,01$). O tratamento com fenofibrato aumentou em 12% a expressão de AT2R no grupo HL-F em relação ao grupo HL (ANOVA, $P<0,01$) (Figura 20).

4.6. Morfometria do tecido adiposo

Os animais HL mostraram uma massa epididimária aumentada quando comparados com os animais C (aumento de 51%; ANOVA, $P<0,0001$). A administração de fenofibrato reduziu a massa de gordura em 36% (ANOVA, $P<0,0001$) nos animais HL-F comparada com a dos animais HL, que mostraram uma massa similar a dos animais C (Tabela 3). Os animais HL também mostraram hipertrofia do adipócito (diâmetro 19% maior comparada com a do grupo C; ANOVA, $P<0,01$), a qual foi reduzida pelo tratamento com fenofibrato (redução de 15% comparada a dos animais HL; ANOVA, $P<0,01$) (Figura 21).

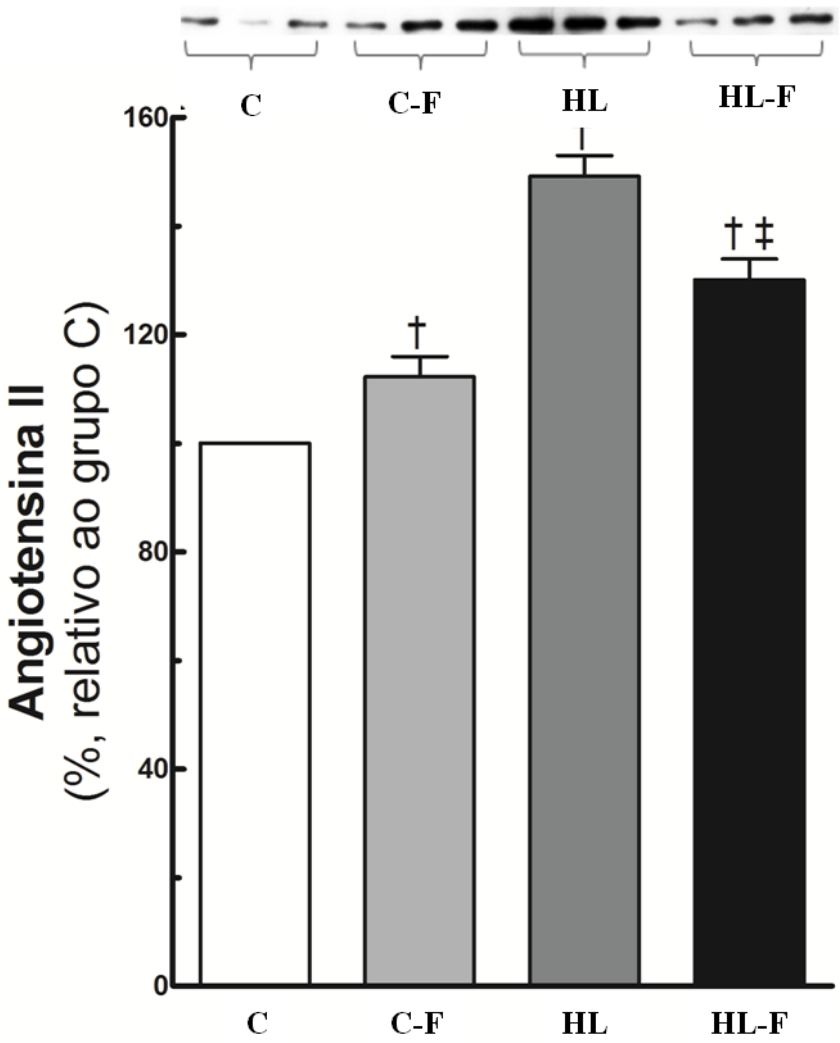


Figura 18 – *Western blotting* da expressão de Angiotensina II no ventrículo esquerdo corrigido por beta-actina (média e erro padrão da média, n = 6 animais em cada grupo). Abreviações: C, dieta controle; C-S, dieta controle mais fenofibrato; HL, dieta hiperlipídica; HL-F, dieta hiperlipídica mais fenofibrato. One-way ANOVA e pós-teste de Tukey: quando comparados, $P<0,05$; se: † quando comparado com C, ‡ com HL.

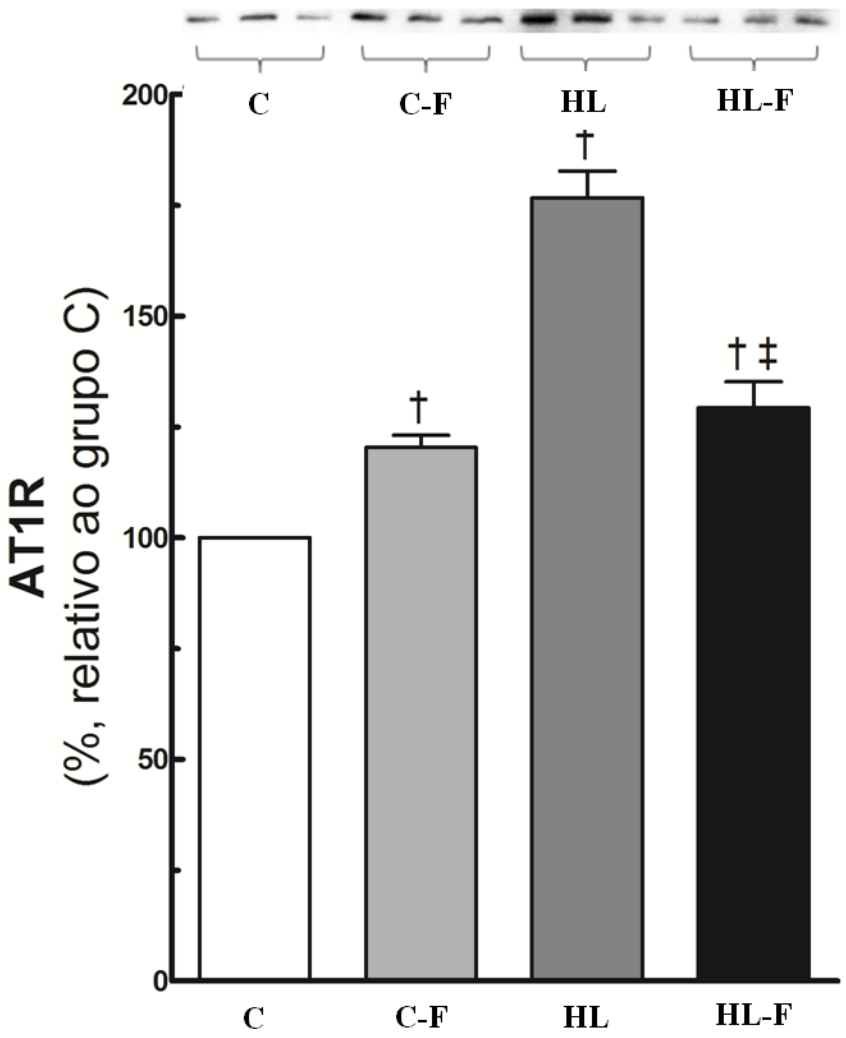


Figura 19 – *Western blotting* da expressão do receptor tipo 1 da Angiotensina II no ventrículo esquerdo corrigido por beta-actina (média e erro padrão da média, n = 6 animais em cada grupo). Abreviações: C, dieta controle; C-S, dieta controle mais fenofibrato; HL, dieta hiperlipídica; HL-F, dieta hiperlipídica mais fenofibrato. One-way ANOVA e pós-teste de Tukey: quando comparados, $P<0,05$; se: † quando comparado com C, ‡ com HL.

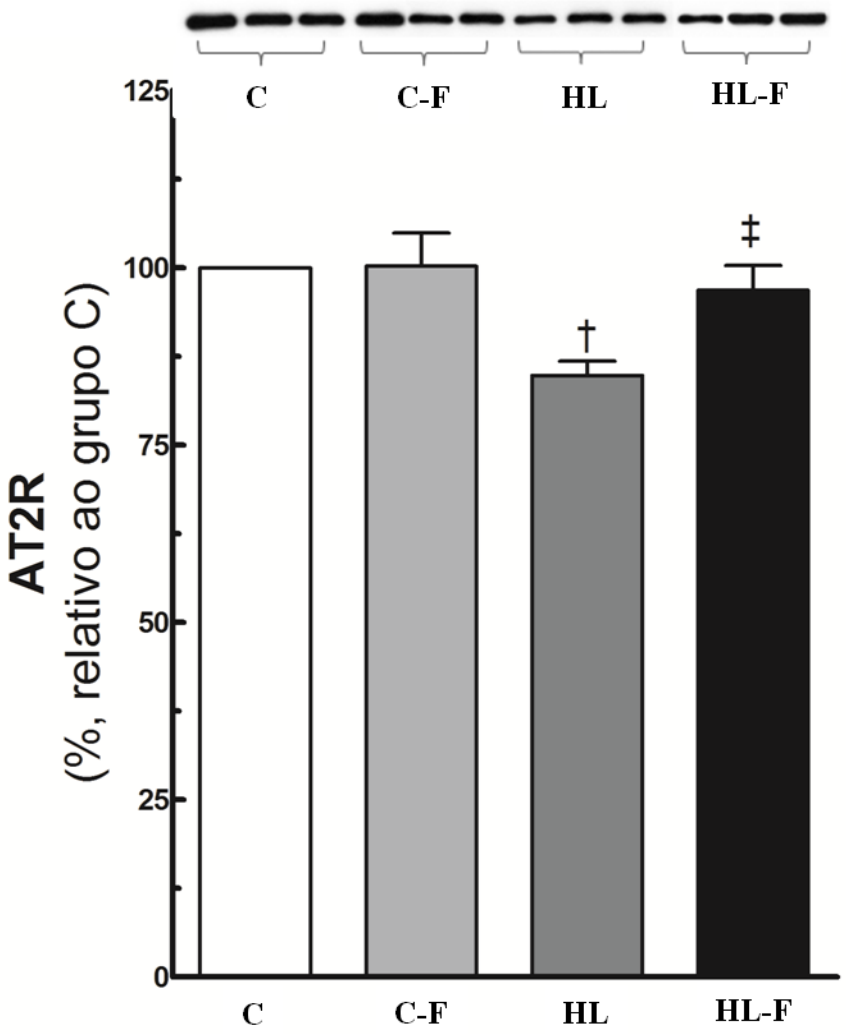


Figura 20 – *Western blotting* da expressão do receptor tipo 2 da Angiotensina II no ventrículo esquerdo corrigido por beta-actina (média e erro padrão da média, n = 6 animais em cada grupo). Abreviações: C, dieta controle; C-S, dieta controle mais fenofibrato; HL, dieta hiperlipídica; HL-F, dieta hiperlipídica mais fenofibrato. One-way ANOVA e pós-teste de Tukey: quando comparados, $P<0,05$; se: † quando comparado com C, ‡ com HL.

4.7. **Esteatose Hepática**

A massa do fígado aumentou após a alimentação com a dieta HL (aumento de 18% comparada a do grupo C; ANOVA, *P*<0,0001), e foi reduzida com o tratamento com fenofibrato (redução de 45% nos animais HL-F comparada a dos animais HL; ANOVA, *P*<0,0001). A massa do fígado nos animais HL-F também foi menor quando comparada com a dos animais C (33% menor; ANOVA, *P*<0,0001). O tratamento com fenofibrato também reduziu a massa do fígado nos animais C-F, que mostrou uma redução de 27% em relação aos animais C (ANOVA, *P*<0,0001) (Tabela 3). A esteatose hepática mostrou o mesmo comportamento. A esteatose foi 70% maior nos animais HL que nos animais C (ANOVA, *P*<0,0001), e reduzida em 42% nos animais HL-F comparada com a dos animais HL (ANOVA, *P*<0,0001). Fenofibrato também reduziu a esteatose no fígado dos animais C-F comparada com a dos animais C (redução de 57%; ANOVA, *P*<0,0001) (Figura 22).

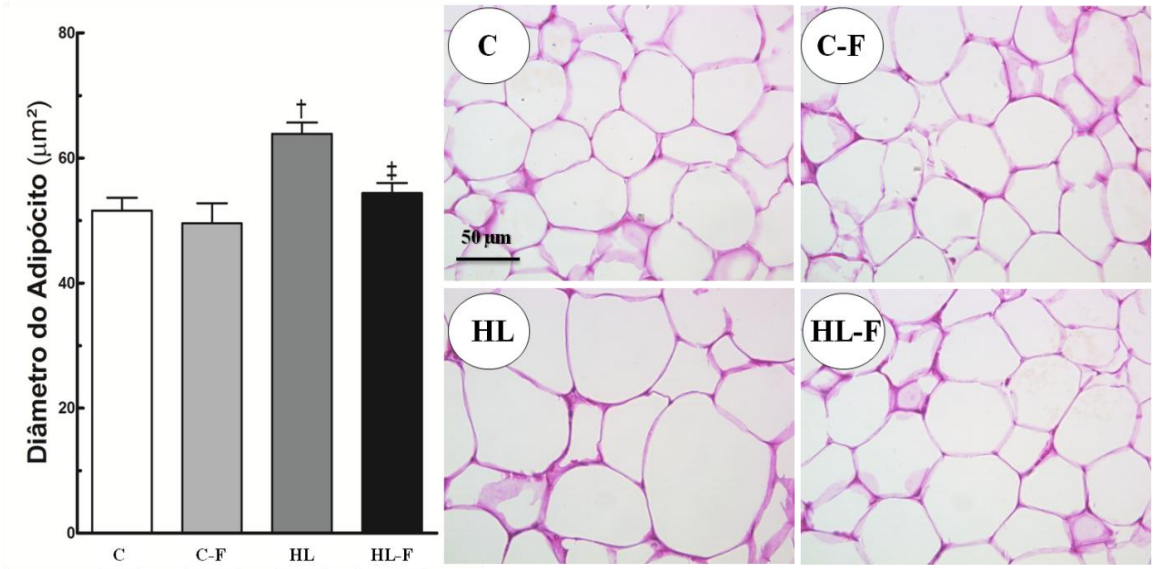


Figura 21 – Diâmetro dos adipócitos no tecido adiposo apididimário (média e erro padrão da média, n = 6 animais em cada grupo). Abreviações: C, dieta controle; C-S, dieta controle mais fenofibrato; HL, dieta hiperlipídica; HL-F, dieta hiperlipídica mais fenofibrato. Notar nas fotomicrografias (hematoxilina e eosina em todos os grupos) adipócitos hipertrofiados no grupo HL a adipócitos com morfologia semelhante ao do grupo C em HL-F. One-way ANOVA e pós-teste de Tukey: quando comparados, *P*<0,05; se: † quando comparado com C, ‡ com HL.

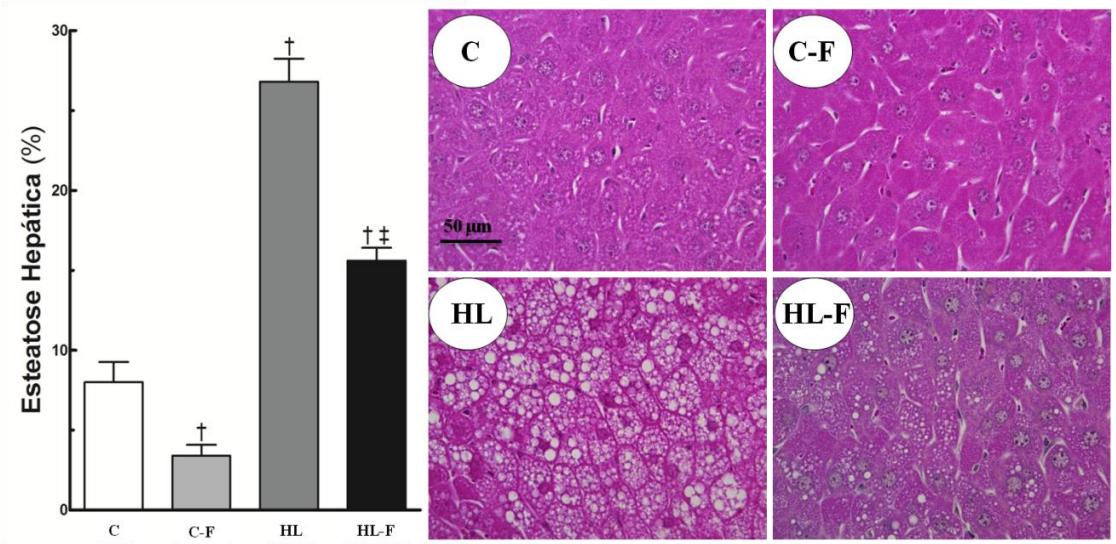


Figura 22 – Esteatose hepática (média e erro padrão da média, n = 6 animais em cada grupo). Abreviações: C, dieta controle; C-S, dieta controle mais fenofibrato; HL, dieta hiperlipídica; HL-F, dieta hiperlipídica mais fenofibrato. Notar nas fotomicrografias (hematoxilina e eosina em todos os grupos) a presença abundante de esteatose micro e macrovesicular no grupo HL e redução da esteatose no grupo HL-L. One-way ANOVA e pós-teste de Tukey: quando comparados, $P<0,05$; se: † quando comparado com C, ‡ com HL.

5. **DISCUSSÃO**

No presente estudo, os animais HL receberam uma grande quantidade de energia e, consequentemente, tiveram uma maior massa corporal e também um metabolismo de glicose alterado. A administração de fenofibrato atenuou o aumento da massa corporal causado pela dieta, assim como o metabolismo de glicose. Fenofibrato foi eficiente em diminuir os níveis séricos de insulina e melhorar a tolerância à glicose e a resistência insulínica. CT, TG e HDL foram todos melhorados nos animais HL-F, assim como a pressão arterial elevada foi atenuada pelo tratamento com fenofibrato. A expressão cardíaca das proteínas ANG II e AT1R foram significativamente reduzidas pelo tratamento com fenofibrato, assim como a expressão de AT2R foi melhorada.

Os animais alimentados com dieta HL e tratados com fenofibrato não mostraram significativa hipertrofia do ventrículo esquerdo como mostrado pelos animais não tratados. Como uma consequência da redução da hipertrofia do cardiomiócito com fenofibrato, ocorreu melhora da relação entre o cardiomiócito e os capilares intramiocárdicos, que é um bom marcador da melhor perfusão miocárdica nestes animais.

Existem evidências de que a obesidade induzida por dieta em camundongos está associada com aumento modesto da pressão arterial (Williams *et al.*, 2003). No presente trabalho, os animais HL tiveram maior pressão arterial comparados com os animais C e a administração de fenofibrato diminuiu essa pressão arterial nos animais HL-F. O efeito redutor da ativação do PPAR-alfa pelo fenofibrato envolve a redução da IL-6 plasmática e da ciclooxigenase-2 (COX-2), concomitante ao aumento da expressão do citocromo P450 4A (CYP4A) (Lee *et al.*, 2011). Por outro lado, ANG II estimula a produção de IL-6 em vários tipos celulares e a IL-6 contribui significativamente pra o controle da hipertensão arterial em animais sensíveis ao sal (Lee *et al.*, 2006). A inibição da sinalização de IL-6 é sugerida como uma terapia potencial para a hipertensão arterial e hipertrofia cardíaca (Diep *et al.*, 2004; Coles *et al.*, 2007), e, no presente trabalho, o tratamento com fenofibrato mostrou uma expressão cardíaca diminuída de ANG II nos animais HL-F, que pode estar relacionada com a redução da pressão arterial que esses animais apresentaram.

Alterações na ingestão de gordura na dieta modula a reatividade vascular em resposta a ANG II e espécies reativas de oxigênio, bem como a expressão dos receptores vasculares para

ANG II e endotelina. Assim, a ingestão de gordura na dieta pode afetar diretamente o risco cardiovascular (Mundy *et al.*, 2007). Ainda, fenofibrato melhora a hipertrofia do ventrículo esquerdo induzida por aldosterona independentemente de um efeito na pressão arterial diminuir a fibrose na matriz extracelular alterada (Lebrasseur *et al.*, 2007; De Silva *et al.*, 2009). Embora a alteração da fibrose miocárdica não tenha sido o objetivo do presente trabalho, observou-se que os animais HL hipertensos tiveram a massa e a espessura do ventrículo esquerdo aumentadas, bem como hipertrofia de cardiomiócitos. A administração de fenofibrato nesses animais reduziu de forma eficiente essas alterações.

O fenofibrato é considerado um mediador dos efeitos benéficos observados no remodelamento cardíaco por inibir a morte celular programada e as quinases ativadas pelo estresse. Sabe-se que o fenofibrato inibe a rota de morte mitocondrial dependente da MAPK e da JNK (quinase terminal c-Jun NH2), na apoptose induzida por aldosterona de miócitos ventriculares (De Silva *et al.*, 2009). A inibição da rota JNK em cultura de cardiomiócitos reforça que a ativação do PPAR-alfa interfere com a rota de sinalização da hipertrofia cardíaca induzida por endotelina-1 através da regulação negativa da atividade de ligação da proteína ativadora-1 (AP-1) (Irukayama-Tomobe *et al.*, 2004b). O efeito negativo do ativador PPAR-alfa, fenofibrato, na hipertrofia cardíaca induzida por endotelina-1 pode ser devida parcialmente à inibição da proteína-quinase ativada por mitógeno p38 no crescimento hipertrófico do cardiomiócito e da rota de sinalização da expressão gênica (Irukayama-Tomobe *et al.*, 2004a).

Os efeitos benéficos do tratamento com fenofibrato sobre o remodelamento do ventrículo esquerdo no grupo HL-F, com redução da massa e da espessura do ventrículo esquerdo, e redução da hipertrofia do cardiomiócito, pode ser em parte explicada por seus efeitos sobre o SRA. Observou-se que a administração de fenofibrato reduziu as expressões de ANG II e AT1R no coração e aumentou a expressão de AT2R. A ativação do PPAR-alfa controla os efeitos pressores e vasoconstritores do AT1R, e durante o bloqueio do AT1R a ativação do PPAR-alfa leva a hipotensão em associação com a ativação do AT2R por um mecanismo provavelmente envolvendo a produção de óxido nítrico (Banks e Oyekan, 2008). Além disso, o agonista PPAR-alfa AVE8134 preveniu a hipertrofia miocárdica, a fibrose e a disfunção cardíaca em ratos com ligação permanente da artéria coronária esquerda, provavelmente por um efeito direto na hipertrofia do cardiomiócito, mas também indiretamente via sinalização do monócito e aumento da produção de óxido nítrico endotelial (Linz *et al.*, 2009).

Em animais hipertensos, a ANG II cardíaca agindo via AT1R aumenta a inflamação, o estresse oxidativo e a morte celular (mais provavelmente via diminuição da regulação da quinase PI 3 e Akt), contribuindo para a hipertrofia e fibrose cardíaca (Xu *et al.*, 2010b). Camundongos transgênicos que superexpressam AT1R humano no coração desenvolvem hipertrofia cardíaca. A contratilidade cardíaca e os mecanismos que fundamentam a dinâmica excitação-contração são alterados. É provável que estas mudanças sejam atribuíveis ao aumento da atividade do SRA devido a superexpressão do AT1R (Rivard *et al.*, 2011). Baixo nível da atividade do AT1R local no miocárdio diferenciado causa hipertrofia cardíaca compensatória, que é massa miocárdica aumentada, mas com retenção da função normal, embora a curto prazo a estimulação aumentada possa induzir disfunção cardíaca com dilatação, fração de ejeção reduzida e fibrose aumentada, mesmo na ausência de alteração na pressão arterial sistêmica (Ainscough *et al.*, 2009), que leva a incidência aumentada de arritmias cardíacas associadas com retardo na repolarização cardíaca (Rivard *et al.*, 2008).

Insuficiência cardíaca avançada é frequentemente associada com a capacidade reduzida de oxidação de ácidos graxos. A hipertrofia cardíaca induzida por ANG II está associada com redução das expressões de PPAR-alfa e de mRNA de enzimas do metabolismo de ácidos graxos (Pellieux *et al.*, 2006). A ativação do PPAR-alfa neutraliza esta redução mediada por ANG II da rota de oxidação de ácidos graxos. A exposição prolongada de miócitos cardíacos a ANG II reduz a regulação da rota de oxidação de ácidos graxos mediada pela síntese aumentada de TNF-alfa (Pellieux *et al.*, 2009). A disfunção cardíaca de ratos obesos pode ser melhorada pela redução dos níveis de AGL. O acúmulo de lipídios intramiocárdicos aumenta o risco de insuficiência cardíaca em ratos obesos pelo aumento da atividade do SRA e dos níveis proteicos de NF-kB e da sintase de óxido nítrico indutível no miocárdio (Sun *et al.*, 2011).

Agonista PPAR-alfa melhora o perfil lipídico, a sensibilidade insulínica e o balanço energético em modelos animais (Chen *et al.*, 2008). Fenofibrato diminui eficientemente os níveis de VLDL-triglicérides e aumenta os níveis de HDL-colesterol em humanos e em camundongos. Mais do que isso, o fenofibrato aumenta o HDL-colesterol por reduzir a transferência dependente da proteína de transferência colesteril-éster (PTCE) de colesterol de HDL para VLDL, visto pela baixa expressão hepática de PTCE e a reduzida quantidade plasmática de VLDL (van der Hoogt *et al.*, 2007). Em concordância com esses relatos, os animais HL-F do presente estudo, tratados com fenofibrato, tiveram redução dos níveis de colesterol e triglicérides e aumento de HDL comparados com os animais não tratados.

A dieta hiperlilpídica induz a resistência insulínica em camundongos. Em animais com estenose de aorta iatrogênica há alterações metabólicas acompanhadas por aumento do remodelamento e disfunção do ventrículo esquerdo, destacando o impacto da resistência insulínica no desenvolvimento da insuficiência cardíaca induzida por esta sobrecarga da pressão arterial (Raher *et al.*, 2008). A lesão miocárdica observada na obesidade induzida por dieta é menos favorável que em indivíduos não obesos, pois a resistência insulínica associada à obesidade leva a uma significativa deposição lipídica no tecido cardíaco e à hipertrofia cardíaca concêntrica. Existe remodelamento miocárdico adverso em camundongos obesos em resposta ao infarto miocárdico e reperfusão que pode ser prejudicial ao coração, levando à insuficiência cardíaca (Thakker *et al.*, 2006).

O fenofibrato é conhecido por inibir o desenvolvimento do diabetes tipo 2 induzido por dieta hiperlipídica e estresse oxidativo (Xie *et al.*, 2007). A ativação do PPAR-alfa em roedores melhora a sensibilidade insulínica por diminuir lipídios ectópicos em tecidos não adiposos. O fenofibrato não apenas reduz os níveis circulantes de AGL e triglicérides, mas também normaliza a hiperinsulinemia e a hiperglicemia em camundongos obesos. A glicemia de camundongos tratados com fenofribrato foi significativamente reduzida no teste intraperitoneal de tolerância à glicoseem comparação com os camundongos controles obesos (Jeong e Yoon, 2009). O mesmo aconteceu com os animais alimentados com dieta hiperlipídica do presente estudo que tiveram uma melhora da tolerância à glicose e da resistência insulínica após o tratamento com fenofibrato.

Observamos as modificações estruturais e metabólicas que ocorrem em camundongos devidas à dieta hiperlipídica. O fenofibrato teve resultados benéficos no tratamento desses animais. O presente estudo tem o potencial de fornecer dados que podem ser significativos para a translação para humanos no tratamento de alterações relacionadas a resistência à insulina e ao diabetes tipo II que cada vez mais são prevalentes na população.

6. **CONCLUSÃO**

A dieta hiperlipídica em camundongos C57Bl/6 causa alterações metabólicas que mimetizam a SM em humanos, observadas pelo aumento da massa corporal seguido por hiperinsulinemia e resistência à insulina. Além disso, o perfil lipídico foi prejudicado com elevação do CT e TG, seguidos pela hipertrofia dos adipócitos da gordura epididimária e esteatose hepática. Os animais com excesso de massa corporal tiveram pressão arterial aumentada e, como consequência, ventrículo esquerdo e cardiomiócitos hipertrofiados. Estas alterações se devem, em parte, a uma desregulação do SRA, representado pelo aumento da expressão proteica de ANG II e AT1R, e diminuição de AT2R. Contudo, o tratamento com fenofibrato reduziu a pressão arterial e a hipertrofia cardíaca com efeitos atenuantes sobre o SRA. Estes efeitos são seguidos por melhora da resistência à insulina e do perfil lipídico. Os dados indicam as ações benéficas do tratamento com fenofibrato, um agonista PPAR-alfa, sobre o SRA e remodelamento cardíaco em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.

REFERÊNCIAS

---. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2004a; 27 Suppl 1:S5-S10.

---. [IV Brazilian guidelines in arterial hypertension]. *Arq Bras Cardiol* 2004b; 82 Suppl 4:7-22.

A IJ, Jeannin E, Wahli W, Desvergne B. Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J Biol Chem* 1997; 272:20108-20117.

Abbasi F, Brown BW, Jr., Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM. Relationship between obesity, insulin resistance, and coronary heart disease risk. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40:937-943.

AbdAlla S, Lother H, Abdel-tawab AM, Quitterer U. The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem* 2001; 276:39721-39726.

Abdelmalek MF, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease as a complication of insulin resistance. *Med Clin North Am* 2007; 91:1125-1149, ix.

Aguila MB, Fernandes-Santos C, Pinheiro-Mulder AR, Faria TS, Mandarim-de-Lacerda CA. 2010. *Hepatic insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease*. In: Molière J, Gauthier L, editors. Insulin resistance: symptons, causes and treatment. Hauppauge, NY: Nova Science Pu. p 1-44.

Ainscough JF, Drinkhill MJ, Sedo A, Turner NA, Brooke DA, Balmforth AJ, Ball SG. Angiotensin II type-1 receptor activation in the adult heart causes blood pressure-independent hypertrophy and cardiac dysfunction. *Cardiovasc Res* 2009; 81:592-600.

Akbiyik F, Ray DM, Gettings KF, Blumberg N, Francis CW, Phipps RP. Human bone marrow megakaryocytes and platelets express PPARgamma, and PPARgamma agonists blunt platelet release of CD40 ligand and thromboxanes. *Blood* 2004; 104:1361-1368.

Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998; 15:539-553.

Alkhouri N, Gornicka A, Berk MP, Thapaliya S, Dixon LJ, Kashyap S, Schauer PR, Feldstein AE. Adipocyte apoptosis, a link between obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis. *J Biol Chem* 2010; 285:3428-3438.

Allende-Vigo MZ. Pathophysiologic mechanisms linking adipose tissue and cardiometabolic risk. *Endocr Pract* 2010; 16:692-698.

Anderson PJ, Critchley JA, Chan JC, Cockram CS, Lee ZS, Thomas GN, Tomlinson B. Factor analysis of the metabolic syndrome: obesity vs insulin resistance as the central abnormality. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25:1782-1788.

Aneja A, El-Atat F, McFarlane SI, Sowers JR. Hypertension and obesity. *Recent Prog Horm Res* 2004; 59:169-205.

Apridonidze T, Essah PA, Iuorno MJ, Nestler JE. Prevalence and characteristics of the metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:1929-1935.

Bader M. Role of the local renin-angiotensin system in cardiac damage: a minireview focussing on transgenic animal models. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34:1455-1462.

Balakumar P, Rohilla A, Mahadevan N. Pleiotropic actions of fenofibrate on the heart. *Pharmacol Res* 2011; 63:8-12.

Balkau B, Charles MA. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet Med* 1999; 16:442-443.

Banks T, Oyekan A. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation attenuated angiotensin type 1-mediated but enhanced angiotensin type 2-mediated hemodynamic effects to angiotensin II in the rat. *J Hypertens* 2008; 26:468-477.

Barrett EJ, Eggleston EM, Inyard AC, Wang H, Li G, Chai W, Liu Z. The vascular actions of insulin control its delivery to muscle and regulate the rate-limiting step in skeletal muscle insulin action. *Diabetologia* 2009; 52:752-764.

Bjorntorp P. Regional obesity and NIDDM. *Adv Exp Med Biol* 1993; 334:279-285.

Bloomgarden ZT. Definitions of the insulin resistance syndrome: the 1st World Congress on the Insulin Resistance Syndrome. *Diabetes Care* 2004; 27:824-830.

Bloomgarden ZT. Insulin resistance concepts. *Diabetes Care* 2007; 30:1320-1326.

Boden G. Ceramide: a contributor to insulin resistance or an innocent bystander? *Diabetologia* 2008; 51:1095-1096.

Boustany CM, Bharadwaj K, Daugherty A, Brown DR, Randall DC, Cassis LA. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287:R943-949.

Boustany CM, Brown DR, Randall DC, Cassis LA. AT1 receptor antagonism reverses the blood pressure elevation associated with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005.

Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Scholmerich J, Bollheimer LC. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol* 2006; 36:485-501.

Campbell SE, Katwa LC. Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29:1947-1958.

Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH, Lynn RB, Zhang PL, Sinha MK, Considine RV. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 1996; 348:159-161.

Carr DB, Utzschneider KM, Hull RL, Kodama K, Retzlaff BM, Brunzell JD, Shofer JB, Fish BE, Knopp RH, Kahn SE. Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome. *Diabetes* 2004; 53:2087-2094.

Cassis LA, English VL, Bharadwaj K, Boustany CM. Differential effects of local versus systemic angiotensin II in the regulation of leptin release from adipocytes. *Endocrinology* 2004; 145:169-174.

Cassis LA, Fettinger MJ, Roe AL, Shenoy UR, Howard G. Characterization and regulation of angiotensin II receptors in rat adipose tissue. Angiotensin receptors in adipose tissue. *Adv Exp Med Biol* 1996; 396:39-47.

Chalasani N, Gorski JC, Asghar MS, Asghar A, Foresman B, Hall SD, Crabb DW. Hepatic cytochrome P450 2E1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003; 37:544-550.

Chen G, Liang G, Ou J, Goldstein JL, Brown MS. Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:11245-11250.

Chen X, Matthews J, Zhou L, Pelton P, Liang Y, Xu J, Yang M, Cryan E, Rybczynski P, Demarest K. Improvement of dyslipidemia, insulin sensitivity, and energy balance by a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist. *Metabolism* 2008; 57:1516-1525.

Chen YD, Golay A, Swislocki AL, Reaven GM. Resistance to insulin suppression of plasma free fatty acid concentrations and insulin stimulation of glucose uptake in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64:17-21.

Chien D, Dean D, Saha AK, Flatt JP, Ruderman NB. Malonyl-CoA content and fatty acid oxidation in rat muscle and liver in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279:E259-265.

Chinetti-Gbaguidi G, Fruchart JC, Staels B. Role of the PPAR family of nuclear receptors in the regulation of metabolic and cardiovascular homeostasis: new approaches to therapy. *Curr Opin Pharmacol* 2005; 5:177-183.

Coles B, Fielding CA, Rose-John S, Scheller J, Jones SA, O'Donnell VB. Classic interleukin-6 receptor signaling and interleukin-6 trans-signaling differentially control angiotensin II-dependent hypertension, cardiac signal transducer and activator of transcription-3 activation, and vascular hypertrophy in vivo. *Am J Pathol* 2007; 171:315-325.

Collins S, Martin TL, Surwit RS, Robidoux J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiol Behav* 2004; 81:243-248.

Cornier MA, Dabelea D, Hernandez TL, Lindstrom RC, Steig AJ, Stob NR, Van Pelt RE, Wang H, Eckel RH. The metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2008; 29:777-822.

Crandall DL, Armellino DC, Busler DE, McHendry-Rinde B, Kral JG. Angiotensin II receptors in human preadipocytes: role in cell cycle regulation. *Endocrinology* 1999; 140:154-158.

Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawatr T, DeFronzo RA, Kahn CR, Mandarino LJ. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest* 2000; 105:311-320.

De Mello WC. Cardiac arrhythmias: the possible role of the renin-angiotensin system. *J Mol Med (Berl)* 2001; 79:103-108.

De Mello WC. Heart failure: how important is cellular sequestration? The role of the renin-angiotensin-aldosterone system. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 37:431-438.

De Mello WC. Novel aspects of angiotensin II action in the heart. Implications to myocardial ischemia and heart failure. *Regul Pept* 2011; 166:9-14.

De Mello WC, Danser AH. Angiotensin II and the heart : on the intracrine renin-angiotensin system. *Hypertension* 2000; 35:1183-1188.

De Silva DS, Wilson RM, Hutchinson C, Ip PC, Garcia AG, Lancel S, Ito M, Pimentel DR, Sam F. Fenofibrate inhibits aldosterone-induced apoptosis in adult rat ventricular myocytes via stress-activated kinase-dependent mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296:H1983-1993.

DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care* 1992; 15:318-368.

Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, Fruchart JC, Tedgui A, Haegeman G, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem* 1999; 274:32048-32054.

Delerive P, Gervois P, Fruchart JC, Staels B. Induction of IkappaBalpha expression as a mechanism contributing to the anti-inflammatory activities of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators. *J Biol Chem* 2000; 275:36703-36707.

Diep QN, Benkirane K, Amiri F, Cohn JS, Endemann D, Schiffrin EL. PPAR alpha activator fenofibrate inhibits myocardial inflammation and fibrosis in angiotensin II-infused rats. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 36:295-304.

Diradourian C, Girard J, Pegorier JP. Phosphorylation of PPARs: from molecular characterization to physiological relevance. *Biochimie* 2005; 87:33-38.

Divoux A, Clement K. Architecture and the extracellular matrix: the still unappreciated components of the adipose tissue. *Obes Rev* 2011; 12:e494-503.

Dodson MV, Mir PS, Hausman GJ, Guan LL, Du M, Jiang Z, Fernyhough ME, Bergen WG. Obesity, metabolic syndrome, and adipocytes. *J Lipids* 2011; 2011:721686.

Duvnjak M, Lerotic I, Barsic N, Tomasic V, Virovic Jukic L, Velagic V. Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13:4539-4550.

Elbaz N, Bedecs K, Masson M, Sutren M, Strosberg AD, Nahmias C. Functional trans-inactivation of insulin receptor kinase by growth-inhibitory angiotensin II AT2 receptor. *Mol Endocrinol* 2000; 14:795-804.

Engeli S, Bohnke J, Gorzelniak K, Janke J, Schling P, Bader M, Luft FC, Sharma AM. Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Hypertension* 2005; 45:356-362.

Escobedo J, Schargrodsky H, Champagne B, Silva H, Boissonnet CP, Vinueza R, Torres M, Hernandez R, Wilson E. Prevalence of the metabolic syndrome in Latin America and its association with sub-clinical carotid atherosclerosis: the CARMELA cross sectional study. *Cardiovasc Diabetol* 2009; 8:52.

Esther CR, Marino EM, Howard TE, Machaud A, Corvol P, Capecchi MR, Bernstein KE. The critical role of tissue angiotensin-converting enzyme as revealed by gene targeting in mice. *J Clin Invest* 1997; 99:2375-2385.

Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 2004; 145:2273-2282.

Fernandes-Santos C, Carneiro RE, de Souza Mendonca L, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Pan-PPAR agonist beneficial effects in overweight mice fed a high-fat high-sucrose diet. *Nutrition* 2009; 25:818-827.

Ferrannini E, Santoro D, Manicardi V. The association of essential hypertension and diabetes. *Compr Ther* 1989; 15:51-58.

Flynn JT, Tullus K. Severe hypertension in children and adolescents: pathophysiology and treatment. *Pediatr Nephrol* 2009; 24:1101-1112.

Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Jama* 2002; 287:356-359.

Ford ES, Li C, Zhao G. Prevalence and correlates of metabolic syndrome based on a harmonious definition among adults in the US. *J Diabetes* 2010; 2:180-193.

Frantz ED, Aguila MB, Pinheiro-Mulder Ada R, Mandarim-de-Lacerda CA. Transgenerational endocrine pancreatic adaptation in mice from maternal protein restriction in utero. *Mech Ageing Dev* 2011; 132:110-116.

Fraulob JC, Ogg-Diamantino R, Fernandes-Santos C, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *J Clin Biochem Nutr* 2010; 46:212-223.

Fruchart JC. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha): at the crossroads of obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2009; 205:1-8.

Gao L, Wang WZ, Wang W, Zucker IH. Imbalance of angiotensin type 1 receptor and angiotensin II type 2 receptor in the rostral ventrolateral medulla: potential mechanism for sympathetic overactivity in heart failure. *Hypertension* 2008; 52:708-714.

Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, Cutson JJ, Johnson L, Dietz KR, Nicol CJ, Vinson C, Gonzalez FJ, Reitman ML. Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biol Chem* 2003; 278:34268-34276.

Gervois P, Chopin-Delannoy S, Fadel A, Dubois G, Kosykh V, Fruchart JC, Najib J, Laudet V, Staels B. Fibrates increase human REV-ERBalpha expression in liver via a novel peroxisome proliferator-activated receptor response element. *Mol Endocrinol* 1999; 13:400-409.

Giugliano D, Ceriello A, Esposito K. The effects of diet on inflammation: emphasis on the metabolic syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48:677-685.

Grommes C, Landreth GE, Heneka MT. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Lancet Oncol* 2004; 5:419-429.

Gruber C, Kohlstedt K, Loot AE, Fleming I, Kummer W, Muhlfeld C. Stereological characterization of left ventricular cardiomyocytes, capillaries, and innervation in the nondiabetic, obese mouse. *Cardiovasc Pathol* 2011.

Gundersen H. Notes on the estimation of numerical densitiy of arbitrary profiles: The edge effect. *Jounal of Microscopy* 1977; 111:219-223.

Gustat J, Srinivasan SR, Elkasabany A, Berenson GS. Relation of self-rated measures of physical activity to multiple risk factors of insulin resistance syndrome in young adults: the Bogalusa Heart Study. *J Clin Epidemiol* 2002; 55:997-1006.

Harris MI, Eastman RC. Early detection of undiagnosed diabetes mellitus: a US perspective. *Diabetes Metab Res Rev* 2000; 16:230-236.

Haussinger D. Liver fibrosis and NA(+)/H(+) exchange. *Gastroenterology* 2001; 120:572-575.

Holness MJ, Sugden MC. The impact of increased dietary lipid on the regulation of glucose uptake and oxidation by insulin in brown- and a range of white-adipose-tissue depots in vivo. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999; 23:629-638.

Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996; 271:665-668.

Hutley L, Prins JB. Fat as an endocrine organ: relationship to the metabolic syndrome. *Am J Med Sci* 2005; 330:280-289.

Iglarz M, Touyz RM, Viel EC, Paradis P, Amiri F, Diep QN, Schiffrin EL. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and receptor-gamma activators prevent cardiac fibrosis in mineralocorticoid-dependent hypertension. *Hypertension* 2003; 42:737-743.

Ip E, Farrell GC, Robertson G, Hall P, Kirsch R, Leclercq I. Central role of PPARalpha-dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2003; 38:123-132.

Irukayama-Tomobe Y, Miyauchi T, Kasuya Y, Sakai S, Goto K, Yamaguchi I. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha decreases endothelin-1-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation in cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004a; 44 Suppl 1:S358-361.

Irukayama-Tomobe Y, Miyauchi T, Sakai S, Kasuya Y, Ogata T, Takanashi M, Iemitsu M, Sudo T, Goto K, Yamaguchi I. Endothelin-1-induced cardiac hypertrophy is inhibited by activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha partly via blockade of c-Jun NH2-terminal kinase pathway. *Circulation* 2004b; 109:904-910.

Issemann I, Prince RA, Tugwood JD, Green S. The peroxisome proliferator-activated receptor:retinoid X receptor heterodimer is activated by fatty acids and fibrate hypolipidaemic drugs. *J Mol Endocrinol* 1993; 11:37-47.

Iwai N, Inagami T. Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS Lett* 1992; 298:257-260.

Jeong S, Yoon M. Fenofibrate inhibits adipocyte hypertrophy and insulin resistance by activating adipose PPARalpha in high fat diet-induced obese mice. *Exp Mol Med* 2009; 41:397-405.

Jones BH, Standridge MK, Moustaid N. Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. *Endocrinology* 1997; 138:1512-1519.

Juhan-Vague I, Alessi MC, Joly P, Thirion X, Vague P, Declerck PJ, Serradimigni A, Collen D. Plasma plasminogen activator inhibitor-1 in angina pectoris. Influence of plasma insulin and acute-phase response. *Arteriosclerosis* 1989; 9:362-367.

Kahn SE, Prigeon RL, Schwartz RS, Fujimoto WY, Knopp RH, Brunzell JD, Porte D, Jr. Obesity, body fat distribution, insulin sensitivity and Islet beta-cell function as explanations for metabolic diversity. *J Nutr* 2001; 131:354S-360S.

Kassi E, Pervanidou P, Kaltsas G, Chrousos G. Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC Med* 2011; 9:48.

Katada J, Majima M. AT(2) receptor-dependent vasodilation is mediated by activation of vascular kinin generation under flow conditions. *Br J Pharmacol* 2002; 136:484-491.

Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PW, Benjamin EJ, Larson MG, Kannel WB, Vasan RS. Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med* 2002; 347:305-313.

Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280:E745-751.

Kim SM, Rico CW, Lee SC, Kang MY. Modulatory Effect of Rice Bran and Phytic Acid on Glucose Metabolism in High Fat-Fed C57BL/6N Mice. *J Clin Biochem Nutr* 2010; 47:12-17.

Kishida K, Funahashi T, Matsuzawa Y, Shimomura I. Visceral adiposity as a target for the management of the metabolic syndrome. *Ann Med* 2011.

Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:7355-7359.

Kobayasi R, Akamine EH, Davel AP, Rodrigues MA, Carvalho CR, Rossoni LV. Oxidative stress and inflammatory mediators contribute to endothelial dysfunction in high-fat diet-induced obesity in mice. *J Hypertens* 2010; 28:2111-2119.

Kumar R, Singh VP, Baker KM. The intracellular renin-angiotensin system: implications in cardiovascular remodeling. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008; 17:168-173.

Kupfahl C, Pink D, Friedrich K, Zurbrugg HR, Neuss M, Warnecke C, Fielitz J, Graf K, Fleck E, Regitz-Zagrosek V. Angiotensin II directly increases transforming growth factor beta1 and osteopontin and indirectly affects collagen mRNA expression in the human heart. *Cardiovasc Res* 2000; 46:463-475.

Kurukulasuriya LR, Stas S, Lastra G, Manrique C, Sowers JR. Hypertension in obesity. *Med Clin North Am* 2011; 95:903-917.

Lebrasseur NK, Duhaney TA, De Silva DS, Cui L, Ip PC, Joseph L, Sam F. Effects of fenofibrate on cardiac remodeling in aldosterone-induced hypertension. *Hypertension* 2007; 50:489-496.

Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* 2000; 105:1067-1075.

Lee DL, Sturgis LC, Labazi H, Osborne JB, Jr., Fleming C, Pollock JS, Manhiani M, Imig JD, Brands MW. Angiotensin II hypertension is attenuated in interleukin-6 knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290:H935-940.

Lee DL, Wilson JL, Duan R, Hudson T, El-Marakby A. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-alpha Activation Decreases Mean Arterial Pressure, Plasma Interleukin-6, and COX-2 While Increasing Renal CYP4A Expression in an Acute Model of DOCA-Salt Hypertension. *PPAR Res* 2011; 2011:502631.

Lee MJ, Wu Y, Fried SK. Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010; 13:371-376.

Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest* 2006; 116:571-580.

Lei F, Zhang XN, Wang W, Xing DM, Xie WD, Su H, Du LJ. Evidence of anti-obesity effects of the pomegranate leaf extract in high-fat diet induced obese mice. *Int J Obes (Lond)* 2007; 31:1023-1029.

Lettner A, Roden M. Ectopic fat and insulin resistance. *Curr Diab Rep* 2008; 8:185-191.

Lewis GF, Steiner G. Acute effects of insulin in the control of VLDL production in humans. Implications for the insulin-resistant state. *Diabetes Care* 1996; 19:390-393.

Lewis GF, Uffelman KD, Szeto LW, Steiner G. Effects of acute hyperinsulinemia on VLDL triglyceride and VLDL apoB production in normal weight and obese individuals. *Diabetes* 1993; 42:833-842.

Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A, Schwarz JM, Lustig RH. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7:251-264.

Linz W, Wohlfart P, Baader M, Breitschopf K, Falk E, Schafer HL, Gerl M, Kramer W, Rutten H. The peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR-alpha) agonist, AVE8134, attenuates the progression of heart failure and increases survival in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2009; 30:935-946.

Ma X, Li Z. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Chin J Dig Dis* 2006; 7:7-11.

Maassen JA, Romijn JA, Heine RJ. Fatty acid-induced mitochondrial uncoupling in adipocytes as a key protective factor against insulin resistance and beta cell dysfunction: a new concept in the pathogenesis of obesity-associated type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2007; 50:2036-2041.

Macdonald GA, Prins JB. Peroxisomal fatty acid metabolism, peroxisomal proliferator-activated receptors and non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19:1335-1337.

Madej A, Okopien B, Kowalski J, Zielinski M, Wysocki J, Szygula B, Kalina Z, Herman ZS. Effects of fenofibrate on plasma cytokine concentrations in patients with atherosclerosis and hyperlipoproteinemia IIb. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1998; 36:345-349.

Mallow H, Trindl A, Loffler G. Production of angiotensin II receptors type one (AT1) and type two (AT2) during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Horm Metab Res* 2000; 32:500-503.

Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc* 2003; 75:469-486.

Mariman EC, Wang P. Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67:1277-1292.

Martin G, Schoonjans K, Lefebvre AM, Staels B, Auwerx J. Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators. *J Biol Chem* 1997; 272:28210-28217.

Martinez MA, Puig JG, Mora M, Aragon R, O'Dogherty P, Anton JL, Sanchez-Villares T, Rubio JM, Rosado J, Torres R, Marcos J, Pallardo LF, Banegas JR. Metabolic syndrome: prevalence, associated factors, and C-reactive protein: the MADRIC (MADrid RIesgo Cardiovascular) Study. *Metabolism* 2008; 57:1232-1240.

Marx N, Kehrle B, Kohlhammer K, Grub M, Koenig W, Hombach V, Libby P, Plutzky J. PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis. *Circ Res* 2002; 90:703-710.

Massiera F, Barbry P, Guesnet P, Joly A, Luquet S, Moreilhon-Brest C, Mohsen-Kanson T, Amri EZ, Ailhaud G. A Western-like fat diet is sufficient to induce a gradual enhancement in fat mass over generations. *J Lipid Res* 2010; 51:2352-2361.

Matsuzawa Y. The role of fat topology in the risk of disease. *Int J Obes (Lond)* 2008; 32 Suppl 7:S83-92.

Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292:C82-97.

Michalik L, Wahli W. Involvement of PPAR nuclear receptors in tissue injury and wound repair. *J Clin Invest* 2006; 116:598-606.

Miyazaki Y, Glass L, Triplitt C, Wajcberg E, Mandarino LJ, DeFronzo RA. Abdominal fat distribution and peripheral and hepatic insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283:E1135-1143.

Montagnani M, Golovchenko I, Kim I, Koh GY, Goalstone ML, Mundhekar AN, Johansen M, Kucik DF, Quon MJ, Draznin B. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances mitogenic actions of insulin in endothelial cells. *J Biol Chem* 2002; 277:1794-1799.

Moraes LA, Piqueras L, Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Ther* 2006; 110:371-385.

Morino K, Petersen KF, Shulman GI. Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 2006; 55 Suppl 2:S9-S15.

Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, Sasamura H, Pratt RE, Dzau VJ. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem* 1993; 268:24539-24542.

Mundy AL, Haas E, Bhattacharya I, Widmer CC, Kretz M, Hofmann-Lehmann R, Minotti R, Barton M. Fat intake modifies vascular responsiveness and receptor expression of vasoconstrictors: implications for diet-induced obesity. *Cardiovasc Res* 2007; 73:368-375.

Munoz MC, Argentino DP, Dominici FP, Turyn D, Toblli JE. Irbesartan restores the in-vivo insulin signaling pathway leading to Akt activation in obese Zucker rats. *J Hypertens* 2006; 24:1607-1617.

Muntoni S, Draznin B. Effects of chronic hyperinsulinemia in insulin-resistant patients. *Curr Diab Rep* 2008; 8:233-238.

Muoio DM, Newgard CB. Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:193-205.

Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:10663-10667.

Nesto RW. The relation of insulin resistance syndromes to risk of cardiovascular disease. *Rev Cardiovasc Med* 2003; 4 Suppl 6:S11-18.

Neuschwander-Tetri BA. Evolving pathophysiologic concepts in nonalcoholic steatohepatitis. *Curr Gastroenterol Rep* 2002; 4:31-36.

Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003; 37:1202-1219.

Ogata T, Miyauchi T, Sakai S, Irukayama-Tomobe Y, Goto K, Yamaguchi I. Stimulation of peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) attenuates cardiac fibrosis and endothelin-1 production in pressure-overloaded rat hearts. *Clin Sci (Lond)* 2002; 103 Suppl 48:284S-288S.

Ogata T, Miyauchi T, Sakai S, Takanashi M, Irukayama-Tomobe Y, Yamaguchi I. Myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats is ameliorated by the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activator fenofibrate, partly by suppressing inflammatory responses associated with the nuclear factor-kappa-B pathway. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43:1481-1488.

Ohsaki Y, Cheng J, Suzuki M, Shinohara Y, Fujita A, Fujimoto T. Biogenesis of cytoplasmic lipid droplets: from the lipid ester globule in the membrane to the visible structure. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1791:399-407.

Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 2011; 11:85-97.

Paizis G, Cooper ME, Schembri JM, Tikellis C, Burrell LM, Angus PW. Up-regulation of components of the renin-angiotensin system in the bile duct-ligated rat liver. *Gastroenterology* 2002; 123:1667-1676.

Paradis V, Perlemuter G, Bonvoust F, Dargere D, Parfait B, Vidaud M, Conti M, Huet S, Ba N, Buffet C, Bedossa P. High glucose and hyperinsulinemia stimulate connective tissue growth factor expression: a potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2001; 34:738-744.

Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 2006; 86:747-803.

Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, Zick Y. A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1997; 272:29911-29918.

Pellieux C, Aasum E, Larsen TS, Montessuit C, Papageorgiou I, Pedrazzini T, Lerch R. Overexpression of angiotensinogen in the myocardium induces downregulation of the fatty acid oxidation pathway. *J Mol Cell Cardiol* 2006; 41:459-466.

Pellieux C, Montessuit C, Papageorgiou I, Lerch R. Angiotensin II downregulates the fatty acid oxidation pathway in adult rat cardiomyocytes via release of tumour necrosis factor-alpha. *Cardiovasc Res* 2009; 82:341-350.

Postic C, Girard J. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes Metab* 2008; 34:643-648.

Putnam K, Shoemaker R, Yiannikouris F, Cassis LA. The Renin Angiotensin System: A Target of and Contributor to Dyslipidemias, Altered Glucose Homeostasis and Hypertension of the Metabolic Syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012.

Raher MJ, Thibault HB, Buys ES, Kuruppu D, Shimizu N, Brownell AL, Blake SL, Rieusset J, Kaneki M, Derumeaux G, Picard MH, Bloch KD, Scherrer-Crosbie M. A short duration of high-fat diet induces insulin resistance and predisposes to adverse left ventricular remodeling after pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 295:H2495-2502.

Rahmouni K, Mark AL, Haynes WG, Sigmund CD. Adipose depot-specific modulation of angiotensinogen gene expression in diet-induced obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 286:E891-895.

Ran J, Hirano T, Fukui T, Saito K, Kageyama H, Okada K, Adachi M. Angiotensin II infusion decreases plasma adiponectin level via its type 1 receptor in rats: an implication for hypertension-related insulin resistance. *Metabolism* 2006; 55:478-488.

Re RN, Cook JL. The basis of an intracrine pharmacology. *J Clin Pharmacol* 2008; 48:344-350.

Reaven G, Abbasi F, McLaughlin T. Obesity, insulin resistance, and cardiovascular disease. *Recent Prog Horm Res* 2004; 59:207-223.

Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37:1595-1607.

Reddy JK, Hashimoto T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr* 2001; 21:193-230.

Reeves PG. AIN-76 diet: should we change the formulation? *J Nutr* 1989; 119:1081-1082.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, 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* 1993; 123:1939-1951.

Rivard K, Grandy SA, Douillette A, Paradis P, Nemer M, Allen BG, Fiset C. Overexpression of type 1 angiotensin II receptors impairs excitation-contraction coupling in the mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301:H2018-2027.

Rivard K, Paradis P, Nemer M, Fiset C. Cardiac-specific overexpression of the human type 1 angiotensin II receptor causes delayed repolarization. *Cardiovasc Res* 2008; 78:53-62.

Roden M. Muscle triglycerides and mitochondrial function: possible mechanisms for the development of type 2 diabetes. *Int J Obes (Lond)* 2005; 29 Suppl 2:S111-115.

Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64:355-365.

Saad F, Gooren L. The role of testosterone in the metabolic syndrome: a review. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009; 114:40-43.

Sakakura Y, Shimano H, Sone H, Takahashi A, Inoue N, Toyoshima H, Suzuki S, Yamada N. Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286:176-183.

Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Mechanisms of insulin resistance in humans and possible links with inflammation. *Hypertension* 2005; 45:828-833.

Savoia C, Burger D, Nishigaki N, Montezano A, Touyz RM. Angiotensin II and the vascular phenotype in hypertension. *Expert Rev Mol Med* 2011; 13:e11.

Schiffrin EL. Peroxisome proliferator-activated receptors and cardiovascular remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288:H1037-1043.

Schmieder RE, Hilgers KF, Schlaich MP, Schmidt BM. Renin-angiotensin system and cardiovascular risk. *Lancet* 2007; 369:1208-1219.

Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J. PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J* 1996; 15:5336-5348.

Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Munzel T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10:1115-1126.

Seki M, Matsuo T, Carrilho AJ. Prevalence of metabolic syndrome and associated risk factors in Brazilian schoolchildren. *Public Health Nutr* 2009; 12:947-952.

Sell H, Eckel J. Adipose tissue inflammation: novel insight into the role of macrophages and lymphocytes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010; 13:366-370.

Shanmugam S, Lenkei ZG, Gasc JM, Corvol PL, Llorens-Cortes CM. Ontogeny of angiotensin II type 2 (AT2) receptor mRNA in the rat. *Kidney Int* 1995; 47:1095-1100.

Sharma AM, Janke J, Gorzelniak K, Engeli S, Luft FC. Angiotensin blockade prevents type 2 diabetes by formation of fat cells. *Hypertension* 2002; 40:609-611.

Shatara RK, Quest DW, Wilson TW. Fenofibrate lowers blood pressure in two genetic models of hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 2000; 78:367-371.

Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, Bashmakov Y, Brown MS, Goldstein JL. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol Cell* 2000; 6:77-86.

Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106:171-176.

Sironi AM, Sicari R, Folli F, Gastaldelli A. Ectopic fat storage, insulin resistance, and hypertension. *Curr Pharm Des* 2011; 17:3074-3080.

Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:1023-1033.

Sloniger JA, Saengsirisuwan V, Diehl CJ, Dokken BB, Lailerd N, Lemieux AM, Kim JS, Henriksen EJ. Defective insulin signaling in skeletal muscle of the hypertensive TG(mREN2)27 rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288:E1074-1081.

Smith AD, Brands MW, Wang MH, Dorrance AM. Obesity-induced hypertension develops in young rats independently of the renin-angiotensin-aldosterone system. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006; 231:282-287.

Smith DH, Dubiel R, Jones M. Use of 24-hour ambulatory blood pressure monitoring to assess antihypertensive efficacy: a comparison of olmesartan medoxomil, losartan potassium, valsartan, and irbesartan. *Am J Cardiovasc Drugs* 2005; 5:41-50.

Sniderman AD, Cianflone K. Substrate delivery as a determinant of hepatic apoB secretion. *Arterioscler Thromb* 1993; 13:629-636.

Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* 1998; 98:2088-2093.

Staels B, Vu-Dac N, Kosykh VA, Saladin R, Fruchart JC, Dallongeville J, Auwerx J. Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase. A potential mechanism for the hypolipidemic action of fibrates. *J Clin Invest* 1995; 95:705-712.

Strazzullo P, Galletti F. Impact of the renin-angiotensin system on lipid and carbohydrate metabolism. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004; 13:325-332.

Suganami T, Ogawa Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J Leukoc Biol* 2010; 88:33-39.

Sun X, Pan H, Tan H, Yu Y. High free fatty acids level related with cardiac dysfunction in obese rats. *Diabetes Res Clin Pract* 2011.

Sutherland LN, Capozzi LC, Turchinsky NJ, Bell RC, Wright DC. Time course of high-fat diet-induced reductions in adipose tissue mitochondrial proteins: potential mechanisms and the relationship to glucose intolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 295:E1076-1083.

Sweazea KL, Lekic M, Walker BR. Comparison of mechanisms involved in impaired vascular reactivity between high sucrose and high fat diets in rats. *Nutr Metab (Lond)* 2010; 7:48.

Szendroedi J, Roden M. Ectopic lipids and organ function. *Curr Opin Lipidol* 2009; 20:50-56.

Tabbi-Anneni I, Buchanan J, Cooksey RC, Abel ED. Captopril normalizes insulin signaling and insulin-regulated substrate metabolism in obese (ob/ob) mouse hearts. *Endocrinology* 2008; 149:4043-4050.

Takeshita Y, Takamura T, Ando H, Hamaguchi E, Takazakura A, Matsuzawa-Nagata N, Kaneko S. Cross talk of tumor necrosis factor-alpha and the renin-angiotensin system in tumor necrosis factor-alpha-induced plasminogen activator inhibitor-1 production from hepatocytes. *Eur J Pharmacol* 2008; 579:426-432.

Tan NS, Michalik L, Noy N, Yasmin R, Pacot C, Heim M, Fluhmann B, Desvergne B, Wahli W. Critical roles of PPAR beta/delta in keratinocyte response to inflammation. *Genes Dev* 2001; 15:3263-3277.

Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 2003; 42:1075-1081.

Taskinen MR. Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice. *Diabetologia* 2003; 46:733-749.

Taylor SI. Deconstructing type 2 diabetes. *Cell* 1999; 97:9-12.

Thakker GD, Frangogiannis NG, Bujak M, Zymek P, Gaubatz JW, Reddy AK, Taffet G, Michael LH, Entman ML, Ballantyne CM. Effects of diet-induced obesity on inflammation and remodeling after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291:H2504-2514.

Tschanz SA, Burri PH, Weibel ER. A simple tool for stereological assessment of digital images: the STEPanizer. *J Microsc* 2011; 243:47-59.

Tsutsumi Y, Matsubara H, Ohkubo N, Mori Y, Nozawa Y, Murasawa S, Kijima K, Maruyama K, Masaki H, Moriguchi Y, Shibasaki Y, Kamihata H, Inada M, Iwasaka T. Angiotensin II type 2 receptor is upregulated in human heart with interstitial fibrosis, and cardiac fibroblasts are the major cell type for its expression. *Circ Res* 1998; 83:1035-1046.

Unger RH, Orci L. Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24 Suppl 4:S28-32.

Urbina EM, Khoury PR, McCoy C, Daniels SR, Kimball TR, Dolan LM. Cardiac and vascular consequences of pre-hypertension in youth. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2011; 13:332-342.

Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Lyons PR, Lassegue B, Griendling KK. Angiotensin II receptor coupling to phospholipase D is mediated by the betagamma subunits of heterotrimeric G proteins in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 1999; 55:142-149.

van der Hoogt CC, de Haan W, Westerterp M, Hoekstra M, Dallinga-Thie GM, Romijn JA, Princen HM, Jukema JW, Havekes LM, Rensen PC. Fenofibrate increases HDL-cholesterol by reducing cholesteryl ester transfer protein expression. *J Lipid Res* 2007; 48:1763-1771.

van Kats JP, Methot D, Paradis P, Silversides DW, Reudelhuber TL. Use of a biological peptide pump to study chronic peptide hormone action in transgenic mice. Direct and indirect effects of angiotensin II on the heart. *J Biol Chem* 2001; 276:44012-44017.

Velkoska E, Warner FJ, Cole TJ, Smith I, Morris MJ. Metabolic effects of low dose angiotensin converting enzyme inhibitor in dietary obesity in the rat. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010; 20:49-55.

Vincent MA, Clerk LH, Rattigan S, Clark MG, Barrett EJ. Active role for the vasculature in the delivery of insulin to skeletal muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005; 32:302-307.

Wang CC, Goalstone ML, Draznin B. Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. *Diabetes* 2004; 53:2735-2740.

Wang H, Storlien LH, Huang XF. Influence of dietary fats on c-Fos-like immunoreactivity in mouse hypothalamus. *Brain Res* 1999; 843:184-192.

Wei Y, Sowers JR, Clark SE, Li W, Ferrario CM, Stump CS. Angiotensin II-induced skeletal muscle insulin resistance mediated by NF-kappaB activation via NADPH oxidase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 294:E345-351.

Weisinger RS, Stanley TK, Begg DP, Weisinger HS, Spark KJ, Jois M. Angiotensin converting enzyme inhibition lowers body weight and improves glucose tolerance in C57BL/6J mice maintained on a high fat diet. *Physiol Behav* 2009; 98:192-197.

Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 2005; 115:1111-1119.

Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:1930-1935.

Williams TD, Chambers JB, Roberts LM, Henderson RP, Overton JM. Diet-induced obesity and cardiovascular regulation in C57BL/6J mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003; 30:769-778.

Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, Henke BR. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem* 2000; 43:527-550.

Xie W, Nie Y, Du L, Zhang Y, Cai G. Preventive effects of fenofibrate on insulin resistance, hyperglycaemia, visceral fat accumulation in NIH mice induced by small-dose streptozotocin and lard. *Pharmacol Res* 2007; 55:392-399.

Xu A, Wang Y, Lam KS, Vanhoutte PM. Vascular actions of adipokines molecular mechanisms and therapeutic implications. *Adv Pharmacol* 2010a; 60:229-255.

Xu J, Carretero OA, Liao TD, Peng H, Shesely EG, Liu TS, Yang JJ, Reudelhuber TL, Yang XP. Local angiotensin II aggravates cardiac remodeling in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010b; 299:H1328-1338.

Yamada T, Horiuchi M, Dzau VJ. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:156-160.

Ye J. Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. *Int J Obes (Lond)* 2009; 33:54-66.

Yoon KH, Ko SH, Cho JH, Lee JM, Ahn YB, Song KH, Yoo SJ, Kang MI, Cha BY, Lee KW, Son HY, Kang SK, Kim HS, Lee IK, Bonner-Weir S. Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:2300-2308.

Yuan L, Li X, Li J, Li HL, Cheng SS. Effects of renin-angiotensin system blockade on the islet morphology and function in rats with long-term high-fat diet. *Acta Diabetol* 2010.

Yvan-Charvet L, Massiera F, Lamande N, Ailhaud G, Teboul M, Moustaid-Moussa N, Gasc JM, Quignard-Boulange A. Deficiency of angiotensin type 2 receptor rescues obesity but not hypertension induced by overexpression of angiotensinogen in adipose tissue. *Endocrinology* 2009; 150:1421-1428.

Zhu S, Wang Z, Heshka S, Heo M, Faith MS, Heymsfield SB. Waist circumference and obesity-associated risk factors among whites in the third National Health and Nutrition Examination Survey: clinical action thresholds. *Am J Clin Nutr* 2002; 76:743-749.

Zhu Y, Qi C, Calandra C, Rao MS, Reddy JK. Cloning and identification of mouse steroid receptor coactivator-1 (mSRC-1), as a coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Gene Expr* 1996; 6:185-195.

Zucker IH, Schultz HD, Patel KP, Wang W, Gao L. Regulation of central angiotensin type 1 receptors and sympathetic outflow in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 297:H1557-1566.

APÊNDICE

PRODUÇÃO DURANTE O DOUTORADO

Neto-Ferreira R., Rocha VN, Torres TS, Mandarim-de-Lacerda CA, Carvalho JJ. **Beneficial effects of rosuvastatin on aortic adverse remodeling in nitric oxide-deficient rats.** *Exp Toxicol Pathol* 2011;**63:**473-478.

Silva-Junior GO, Torres TS, Mendonca LS, Mandarim-de-Lacerda CA. **Rosiglitazone (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma) counters hypertension and adverse cardiac and vascular remodeling in 2K1C hypertensive rats.** *Exp Toxicol Pathol* 2011;**63:**1-7.

Marques CMM, Motta V, Torres TS, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. **Beneficial effects of exercise training (treadmill) on insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in high-fat fed C57BL/6 mice.** *Braz J Med Biol Res* 2010;**43:**467-475.

Torres TS, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. **Rosiglitazone reverses cardiac adverse remodeling in perinatal low protein rat offspring.** *Pathol Res Pract* 2010;**206:**642-646.

Professor substituto do Departamento de Anatomia da Univarsidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) no período de 09/2009 a 02/2011.

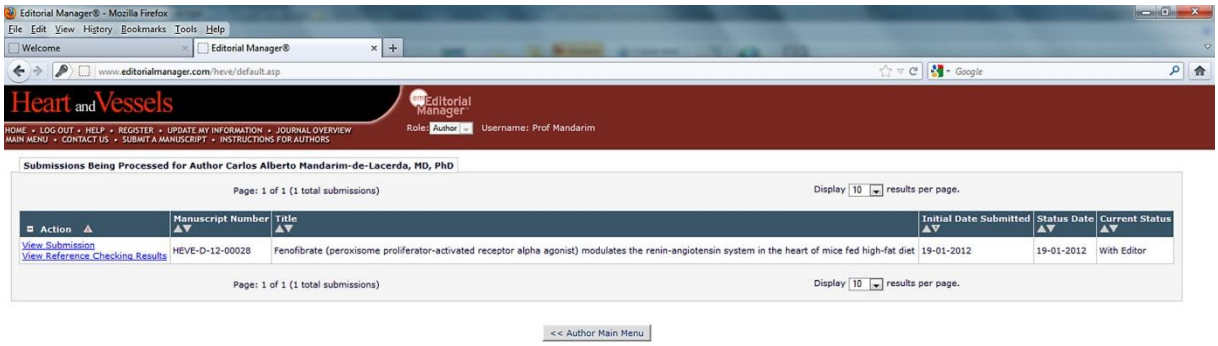
Nomeado em Concurso Público de Provas e Títulos, homologado pelo Conselho de Ensino e Pesquisa e pelo Edital n**o-** 25/2010, publicado no D.O.U. de 02/02/2010, para o cargo de Professor da Carreira do Magistério Superior, na classe de Professor Assistente, nível 1, do Quadro Permanente da Universidade Federal Fluminense (UFF), para ter exercício no Departamento de Ciências Básicas do Polo Universitário de Nova Friburgo (PUNF), Área de Conhecimento: Anatomia Humana, em regime de Dedicação Exclusiva.

Dear Prof. Mandarim-de-Lacerda,

Your submission entitled "Fenofibrate (peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist) modulates the renin-angiotensin system in the heart of mice fed high-fat diet" has been assigned the following manuscript number: HEVE-D-12-00028.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author.
The URL is http://heve.edmgr.com/.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Office
Heart and Vessels
hvedit@bz02.plala.or.jp