



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

Francielle Graus Frazão Nunes

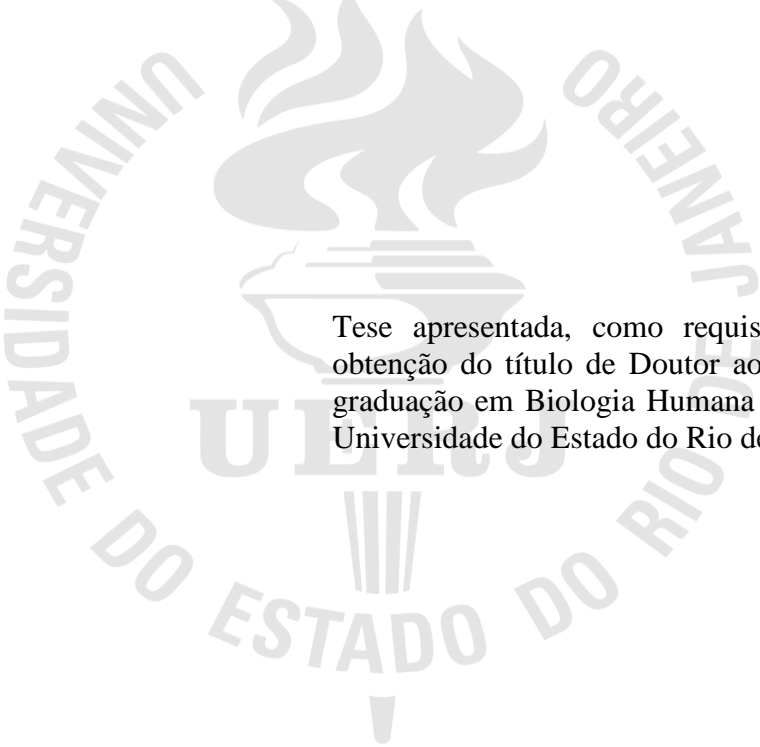
**Efeitos de bloqueadores do receptor AT1 no adipócito e na ilhota
pancreática: benefícios morfofuncionais em modelo murino de obesidade
induzida por dieta**

Rio de Janeiro

2018

Francielle Graus Frazão Nunes

**Efeitos de bloqueadores do receptor AT1 no adipócito e na ilhota pancreática:
benefícios morfofuncionais em modelo murino de obesidade induzida por dieta**



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

Orientadora: Prof^a. Dra. Vanessa de Souza Mello

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

N972 Nunes, Francielle Graus Frazão.

Efeitos de bloqueadores do receptor AT1 no adipócito e na ilhota pancreática: benefícios morfofuncionais em modelo murinho de obesidade induzida por dieta / Francielle Graus Frazão Nunes – 2018.

122 f.

Orientadora: Vanessa de Souza Mello

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

1. Obesidade - Teses. 2. Adipócitos – Teses. 3. Homeostase – Teses. 4. Receptores de Angiotensina. 5. Ilhotas Pancreáticas. 6. Langerhans, Ilhotas de. I. Mello, Vanessa de Souza. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 613.24

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira.
CRB7/6382

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

Assinatura

Data

Francielle Graus Frazão Nunes

**Efeitos de bloqueadores do receptor AT1 no adipócito e na ilhota pancreática:
benefícios morfofuncionais em modelo murino de obesidade induzida por dieta**

Tese apresentada, como requisito parcial para a 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 22 de fevereiro de 2018.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Vanessa de Souza Mello (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarim de Lacerda

Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane

Instituto de Nutrição – UERJ

Prof.^a Dra. Isis Hara Trevenzoli

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Isabele Bringhenti Sarmento

Universidade Federal de Juiz de Fora

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Jussara e Francisco, por serem minha fortaleza, mesmo distante, por dedicarem todo o seu tempo, carinho e amor incondicional, por tornar a ausência algo mais fácil do que muitas vezes me pareceu ser e sempre me incentivarem a buscar cada vez mais. Sempre faltarão palavras para agradecer. Ao meu irmão, por presentear-me com a minha sobrinha e afilhada Alícia. Eu amo vocês!

Ao meu namorado, Thiago Belota e Família (Belota e Silva), por todo carinho e compreensão nos momentos em que precisei me ausentar e pela paciência durante os momentos de ansiedade. Obrigada por ser meu porto seguro, me apoiar, incentivar e pelo companheirismo ao longo desses anos.

As minhas amigas, Bruna Luiza, Fernanda e Nathalia, por diminuírem a saudade que sinto de casa, pela atenção, paciência e carinho em todos os momentos ao longo da minha vida.

Aos Professores, Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda e Dra. Márcia Barbosa Águila, por me receberem tão bem no LMMC, pelas oportunidades e por serem uma fonte de inspiração.

Ao amigo, Prof. Dr. Célio Rodrigues, pelo incentivo, apoio, essencial para ingressar nessa etapa da minha vida. Meu muitíssimo obrigado.

A minha orientadora, que carinhosamente chamo de Orienta/Mãe científica, Prof. Dra. Vanessa de Souza Mello, me faltam palavras para descrever esses 6 anos ao seu lado! O carinho e a admiração só aumentaram, foi uma honra ser sua primeira orientada de doutorado, espero ter correspondido as expectativas! Gostaria de deixar registrado que você é parte essencial desse processo de amadurecimento científico, grata pelo privilégio de ser orientada por você, por me permitir aprender e crescer. Muito obrigada por me acolher tão bem, não tenho dúvidas de que fui apresentada.

A amiga Thaty Marinho, por todo cuidado e carinho ao longo desses 6 anos, pela paciência (que talvez tenha sido muita), pelas diversas risadas e puxões de orelha. Obrigada pela parceria científica, trabalhar com você foi incrível, fico muito feliz por poder acompanhar seu crescimento, tenho certeza de que você irá longe “células estreladas”! Agradeço por tornar a minha vida mais leve e agradável aqui no Rio de Janeiro.

Aos amigos Verônica e Helder, por todo carinho, risadas ao longo desses anos, conselhos e por tornar os dias mais divertidos.

Ao meu *IC* Felipe Oliveira, obrigada pela parceria, dedicação e interesse durante todas as etapas do projeto. Tenho certeza de que você tem um futuro brilhante pela frente e tenho muito orgulho de você.

As amigas científicas, Flavia Veiga e Tamiris Rachid, muito obrigada por partilhar comigo o conhecimento de vocês, foi ótimo trabalhar com vocês tenho uma imensa admiração e torço pra que tenham muito sucesso!

As queridas Aline, a Pós-Doutoranda Fernanda Ornellas, Prof^a. Dra Sandra Barbosa e Prof^a. Dra Isabele Bringhenti, por todo cuidado, carinho e apoio de sempre, pelos conselhos ao longo desses anos, muito obrigada.

Aos amigos que já não fazem parte do LMMC: Alini Schutz, D'Angelo, Guilherme, Willian e a técnica Gezileia, obrigada pelos conselhos e ensinamentos. A vocês o meu carinho.

Aos companheiros do LMMC: Bianca, Filipe, Janaina, Luana, Priscila, Raquel, Tamiris Petito, Renata, Celina, Iara, Jorge, Thais, Victor, Fabiane, Prof^a. Dra Thereza Bargut e Prof. Dr. Luís Eduardo pelos momentos de motivação e sabedoria.

A técnica Michele, pela ajuda no preparo do material e toda assistência.

Aos secretários do BHEX, muito obrigada por toda atenção e cuidado para resolver meus problemas, Carol e José Carlos, vocês são ótimos! Agradeço também a secretária Isabel, que vivia tentando solucionar quando eles não estavam e/ou simplesmente ficava ouvindo-me desabafar quando precisava resolver algo, muito obrigada por tudo.

Gostaria de agradecer as agências de fomento, CAPES e FAPERJ, pelo suporte e investimento financeiro para que pudesse ser realizado este trabalho.

À todos, familiares, amigos, professores, colegas e alunos, meu muito obrigada por contribuírem e/ou fazerem parte do meu crescimento pessoal e científico ao longo da minha vida. Gratidão!

Se você pode sonhar, você pode fazer.

Walt Disney

RESUMO

NUNES, Francielle Graus Frazão. **Efeitos de bloqueadores do receptor AT1 no adipócito e na ilhota pancreática: benefícios morfofuncionais em modelo murino de obesidade induzida por dieta.** 2018. 122f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2018.

O presente estudo teve como objetivo avaliar os bloqueadores do receptor AT1 quanto a formação de adipócitos bege, remodelamento de adipócitos no tecido adiposo branco subcutâneo com foco na expressão de genes termogênicos; e os efeitos da losartana (um BRA puro) e telmisartana (BRA *dual*, agonista parcial PPAR-gama), com enfoque no remodelamento das ilhotas, na detecção de glicose através da via Akt-FOXO1 e PDX1 em um modelo de obesidade induzido por dieta. Camundongos C57BL / 6 foram alimentados com uma comida controle (C, 10% de energia de lipídios) ou uma dieta rica em gordura (HF, 50% de energia de lipídios) por 10 semanas. Então, o tratamento foi iniciado com Telmisartana (T) ou Losartana (L), formando os seguintes grupos: C, C-L, C-T, HF, HF-L e HF-T. O tratamento durou 5 semanas. Os grupos *Pair feeding* (PF) foram realizados com grupos tratados com telmisartana (C-T/PF e HF-T/PF) para isolar os efeitos do tratamento. As abordagens bioquímicas, morfométricas, estereológicas e moleculares foram utilizadas para avaliar os resultados. As diferenças entre os grupos foram testadas com ANOVA de um fator e pós teste de *Holm-Sidak*. A dieta HF provocou excesso de peso, resistência à insulina, hipertensão, hipertrofia de adipócitos, aumento das massas de células alfa e beta. Apesar de abordar a maioria das alterações, a losartana não reduziu a glicemia de jejum como fez a telmisartana. No tecido adiposo, o grupo HF-L apresentou maior gasto energético entre os grupos, juntamente com a presença de adipócitos multiloculares positivos para UCP1 com níveis aumentados de mRNA de PGC1-alfa e PRDM16, indicando um potencial significativo para biogênese mitocondrial e termogênese adaptativa, além da indução de adipócitos bege dentro da gordura subcutânea. Os níveis adequados de insulina e a estrutura preservada do pâncreas endócrino estão correlacionados ao funcionamento adequado da via AKT-FOXO1 em animais HF-L. Por outro lado, a telmisartan produziu uma melhora da expressão de PDX1 e GLP-1 na ilhota, juntamente com níveis maiores de GLP-1, com conseqüente melhoria da detecção e absorção de glicose pelas ilhotas. Uma maior vascularização da ilhota, juntamente com a apoptose reduzida e infiltração de macrófagos, parece estar subjacente aos achados benéficos em ambos os tratamentos. Nossos resultados mostram evidências convincentes de que a losartana respondeu a obesidade induzida pela dieta em camundongos, aumentando o gasto de energia através da indução de adipócitos bege. A massa corporal reduzida, o aumento da sensibilidade à insulina, a diminuição do tamanho dos adipócitos e a expressão de UCP1 por adipócitos multiloculares ectópicos apoiam esses achados. O uso da losartana como um medicamento coadjuvante para combater a obesidade e seus distúrbios relacionados merece uma investigação mais aprofundada. Outros efeitos de telmisartana incluem restauração da massa corporal, sem influência da ingestão energética, juntamente com glicemia normal, no entanto, ambos os BRAs produziram redução da apoptose e preservação das ilhotas.

Palavras-chave: Losartana. Telmisartana. Adipócito bege. Gordura inguinal. Obesidade.

UCP1. PRDM16. Ilhota pancreática. Homeostase de glucose. Apoptose.

ABSTRACT

NUNES, Francielle Graus Frazão. **Effects of AT1 receptor blockers on adipocyte and pancreatic islet: morphofunctional benefits in murine model of diet-induced obesity.** 2018. 122f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2018.

The present study aimed to evaluate AT1 receptor blockers on the formation of beige adipocytes, adipocyte remodeling in subcutaneous white adipose tissue with a focus on the expression of thermogenic genes; and the effects of losartan (a pure BRA) and telmisartan (dual BRA, PPAR-gamma partial agonist), focusing on islet remodeling, glucose detection via the Akt-FOXO1 and PDX1 pathway in a diet-induced obesity model. C57BL/6 mice were fed a standard chow (C; 10 % lipids) or a high-fat diet (HF; 50 % lipids) for 10 weeks. Then, treatment started with Telmisartan (T) or Losartan (L), forming the following groups: C, C-L, C-T, HF, HF-L, and HF-T. Treatment lasted 5 weeks. Pair feeding (PF) groups were carried out with telmisartan treated groups (C-T/PF and HF-T/PF) to isolate the effects of the treatment. Biochemical, morphometrical, stereological and molecular approaches were used to evaluate the outcomes. Differences between groups were tested with one-way ANOVA and Holm-Sidak post-test. The HF diet elicited overweight, insulin resistance, hypertension, adipocyte hypertrophy, great alpha and beta-cell masses. Despite tackling the majority of the alterations, losartan did not reduce fasting glycaemia as telmisartan did. In the adipose tissue, HF-L group presented greatest energy expenditure among the groups along with the presence UCP1 positive multilocular adipocytes with enhanced PGC1-alpha and PRDM16 mRNA levels, indicating a significant potential for mitochondrial biogenesis and adaptive thermogenesis, besides the induction of beige adipocytes within the subcutaneous fat. Suitable insulin levels and preserved endocrine pancreas structure are correlated to adequate AKT-FOXO1 pathway functioning in HF-L animals. Conversely, telmisartan yielded enhanced PDX1 and GLP-1 islet expression along with greater GLP-1 levels, with the consequent better islet glucose sensing and uptake. Greater islet vascularisation coupled with reduced apoptosis and macrophage infiltration seems to underlie the beneficial findings in both treatments. Our results show compelling evidence that losartan countered diet-induced obesity in mice by enhancing energy expenditure through beige adipocytes induction. Reduced body mass, increased insulin sensitivity, decreased adipocyte size and marked expression of UCP1 by ectopic multilocular adipocytes support these findings. The use of losartan as a coadjutant medicine to tackle obesity and its related disorders merits further investigation. Additional telmisartan effects include restoration of body mass, with no influence of energy intake, coupled with normal glycaemia. However, both ARBs yielded reduced apoptosis and islet preservation.

Keywords: Losartan. Telmisartan. Beige adipocyte. Inguinal fat. Obesity. UCP1. PRDM16. Pancreatic islet. Glucose homeostasis. Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Doenças associadas à Síndrome Metabólica e suas complicações secundárias.....	20
Figura 2 – Principais alterações morfológicas e funcionais do TA no desenvolvimento da obesidade.....	24
Figura 3 – Atuação da insulina atua na célula de um pâncreas saudável e um pâncreas DM2.....	25
Figura 4 – Metabolismo normal versus resistência à insulina.....	27
Figura 5 – SRA clássico e seus efeitos conhecidos mediado pelos receptores.....	31
Figura 6 – TAB com sua característica unilocular.....	35
Figura 7 – TAM e sua característica multilocular.....	36
Figura 8 – Tecido adiposo bege.....	38
Figura 9 – Distribuição das células na ilhota pancreática.....	40
Figura 10 – Via de sinalização AKT/FOXO1 e sua relação com PDX1.....	43
Figura 11 – Desenho experimental. Linha do tempo, demonstrando o período de administração da dieta com e sem tratamento.....	47
Figura 12 – Isolamento das ilhotas pancreáticas pelo método da colagenase.....	58
Figura 13 – Ingestão alimentar em energia (kJ), referente ao período de tratamento (5 semanas).....	60
Figura 14 – Massa corporal pré-tratamento (10 ^a semana de intervenção dietética) e pós-tratamento (última semana de tratamento, 5 ^a semana).....	62
Figura 15 – Pressão arterial sistólica (PAS).....	63
Figura 16 – Teste de tolerância oral à glicose (A) e AUC (B).....	64
Figura 17 – Glicemia plasmática de jejum (A) e insulina plasmática (B).....	65
Figura 18 – Histologia de tecido adiposo branco subcutâneo e distribuição de tamanho.....	68
Figura 19 – Distribuição das gorduras intra-abdominal e subcutânea.....	69
Figura 20 – Gasto Energético – EE (a); Produção de dióxido de carbono (b); Captação de oxigênio (c); Taxa de troca respiratória (d).....	70
Figura 21 – Expressão genética das isoformas de PPAR (A); PGC1-alfa, NRF1 e TFAM (B) no tecido adiposo branco subcutâneo.....	71

Figura 22 – Expressão genética de B3-AR, BMP8-b, UCP1 (A) e CD137, PRDM16, Irisinha (B) no tecido adiposo branco subcutâneo.....	73
Figura 23 – Expressão genética de NF-KB, TNF-alfa, IL-6 e adiponectina no tecido adiposo branco subcutâneo.....	74
Figura 24 – Imunofluorescência para UCP1 e AT1R no tecido adiposo branco subcutâneo (TABs).....	78
Figura 25 – Esquema do mecanismo hipotetizado a formação dos adipócitos bege induzidos por losartana em um modelo alimentado com alto teor de gordura.....	80
Figura 26 – Insulina (A), HOMA IR (B), BETA (C) e GLP1 (D).....	83
Figura 27 – Concentrações plasmáticas e imunofluorescência de GLP1.....	84
Figura 28 – Imunofluorescência da distribuição das células da ilhotas (glucagon e insulina), expressão de PDX1, infiltração de macrófagos (F4 / 80) e apoptose nas células da ilhota (TUNEL) e imuno-histoquímica da caspase – 3 total.....	89
Figura 29 – Imunofluorescência (VEGF e α -SMA) e imuno-histoquímica (α -SMA e CD31) para vascularização das ilhotas.....	90
Figura 30 – Níveis de expressão proteica em ilhotas pancreáticas. Expressão: p-AKT (A), p-FOXO1 (B), PDX1 (C), Glicoquinase (D), GLUT2 (E) e AT1R (F). Blots representativos (G).....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Valores de glicose plasmática (em mg/dL) para diagnóstico de diabetes <i>mellitus</i> e seus estágios pré-clínicos.....	26
Tabela 2 –	Composição das dietas experimentais. De acordo com recomendações da AIN-93M.....	46
Tabela 3 –	Detalhamento dos <i>primers</i> utilizados.....	53
Tabela 4 –	Metabolismo de carboidratos e remodelamento do tecido adiposo.....	67
Tabela 5 –	Estereologia do pâncreas e citoarquitetura da ilhota.....	86

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

A [ilhota]	Área seccional média da ilhota
AGL	Ácidos graxos livres
AIN	Instituto Americano de Nutrição
AKT	Proteína quinase b
Alfa-SMA	Alfa actina de músculo liso
ANG I	Angiotensina I
ANG II	Angiotensina II
AT1R	Receptor de angiotensina tipo 1
AT2R	Receptor de angiotensina tipo 2
AUC	Área sob a curva
AVC	Acidente vascular cerebral
BRA	Bloqueadores dos receptores de angiotensina
BSA	Albumina sérica bovina
C	Dieta controle
C-L	Dieta controle, animais tratados com losartana
C-T	Dieta controle, animais tratados com telmisartana.
C-T/PF	Dieta controle, animais não tratados, <i>pair fed</i>
DAPI	4,6-diamidíno-2fenilindola, dihidroclorido
DM1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DNase	Desoxirribonuclease
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EE	Gasto de energia ou gasto energético
EHNA	Esteatose hepática não-alcoólica
F4/80	Proteína restrita a macrófagos
FOXO1	Fator de transcrição <i>forkhead 1 (forkhead transcription factor 1)</i>
FOXO2	Fator de transcrição <i>forkhead 2 (forkhead transcription factor 2)</i>
G6Pase	Glicose-6-fosfatase
GK	Glicoquinase
GLP1	Pepitideo similar ao glucagon 1

GLUT2	Transportador de glicose 2
GSIS	Secreção de insulina estimulada pela glicose
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HE	Hematoxilina-eosina
HF	Dieta hiperlipídica
HF-L	Dieta hiperlipídica, animais tratados com losartana
HF-T	Dieta hiperlipídica, animais tratados com telmisartana
HF-T/PF	Dieta hiperlipídica, animais não tratados, <i>pair fed</i>
HOMA	Modelo de homeostase
IL-6	Interleucina-6
Kcal	Quilocalorias
kJ	Quilojaules
LMMC	Laboratório de morfometria, metabolismo e doença cardiovascular
M[ilhota]	Ilhota massa de ilhotas
MC	Massa corporal
Myf5+	Fator miogênico 5 positivo
OMS	Organização mundial de saúde
PBS	Tampão fosfato salino
PDX1	Fator homeobox pancreático-duodenal 1
PGC1-alfa	Coativador do receptor agonista proliferador de peroxisoma gama 1-alfa
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PP	Pontos parciais
PPAR	Receptor agonista proliferador de peroxisoma
PRDM16	Domínio pr contendo proteína 16
PT	Pontos totais
QA [ilhota]	Densidade numérica por área das ilhotas
QUICKI	Índice quantitativo de verificação de sensibilidade à insulina
RA β 3	Receptor beta 3 adrenérgico
RI	Resistência à insulina
RNA	Ácido ribonucleico
RQ	Quociente respiratório
RT-q PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real
SRA	Sistema renina angiotensina

SUS	Sistema único de saúde
TAB	Tecido adiposo branco
TABs	Tecido adiposo branco subcutâneo
TAG	Triacilglicerol
TAM	Tecido adiposo marrom
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral – alfa
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
UCP1	Proteína desacopladora 1
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VCO ₂	Produção de gás carbônico
VO ₂	Consumo máximo de oxigênio
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
Vv	Densidade de volume

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	REVISÃO DE LITERATURA	20
1.1	Síndrome metabólica	20
1.2	Obesidade	22
1.3	Diabetes	24
1.4	Resistencia à insulina	27
1.5	Hipertensão	28
1.6	Sistema renina-angiotensina	29
1.7	Bloqueadores dos receptores de angiotensina II	32
1.7.1	<u>Losartana</u>	32
1.7.2	<u>Telmisartana</u>	33
1.8	Tecido adiposo	34
1.8.1	<u>Tecido adiposo branco</u>	34
1.8.2	<u>Tecido adiposo marrom</u>	36
1.8.3	<u>Tecido adiposo bege</u>	36
1.9	Pâncreas	37
1.9.1	<u>Aspectos morfofuncionais das ilhotas pancreáticas</u>	41
2	OBJETIVOS	44
2.1	Geral	44
2.2	Específicos	44
3	MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1	Animais, dieta e tratamento	45
3.2	Ingestão alimentar, massa corporal (mc) e pressão arterial (pa)	48
3.3	Calorimetria indireta	48
3.4	Teste oral de tolerância à glicose (totg)	49
3.5	Sacrifício e extração dos tecidos	49
3.6	Análise plasmática	49
3.7	Tecido adiposo	50

3.8	Morfometria de adipócitos.....	51
3.9	Estereologia do tecido adiposo.....	51
3.10	Imunofluorescência do tecido adiposo.....	52
3.11	PCR quantitativo em tempo real (rt-qPCR).....	52
3.12	Pâncreas.....	54
3.13	Microscopia de luz.....	54
3.14	Estereologia do pâncreas.....	55
3.15	Imunohistoquímica e imunofluorescência das ilhotas.....	56
3.16	Isolamento das ilhotas.....	57
3.17	Western blotting das ilhotas isoladas.....	58
3.18	Análise estatística.....	59
4	RESULTADOS	60
4.1	Ingestão energética e massa corporal.....	60
4.2	Pressão arterial sistólica.....	62
4.3	Parâmetros metabólicos.....	63
5	RESULTADOS TECIDO ADIPOSEO.....	66
5.1	Remodelamento do tecido adiposo.....	66
5.2	Gasto energético e calorimetria indireta.....	69
5.3	PCR quantitativo em tempo real.....	70
5.3.1	<u>Expressão gênica dos PPARs.....</u>	70
5.3.2	<u>Expressão de genes termogênicos.....</u>	72
5.3.3	<u>Expressão de genes relacionados à inflamação.....</u>	74
5.4	Imunofluorescência do tecido adiposo branco subcutâneo.....	75
6	DISCUSSÃO DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO SUBCUTÂNEO.....	76
7	RESULTADOS DO PÂNCREAS.....	82
7.1	Índice HOMA (IR e BETA) e concentrações plasmáticas de GLP1.....	82
7.2	Análises pancreáticas – morfometria e estereologia do pâncreas endócrino..	84
7.3	Western blotting das ilhotas pancreáticas.....	92
8	DISCUSSÃO DO PÂNCREAS.....	96
	CONCLUSÕES.....	102
	REFERÊNCIAS	104
	APÊNDICE – Comitê de ética.....	120
	ANEXO - Artigos aceitos.....	121

INTRODUÇÃO

A obesidade é um problema de saúde pública a nível mundial e sua incidência tem aumentado nas últimas décadas, tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento (Swinburn, Sacks et al. 2011). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a obesidade é provocada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, podendo levar a prejuízos na saúde que culminam com a redução da expectativa de vida dos indivíduos (Dunham-Snary and Ballinger 2013).

A obesidade está associada com uma variedade de outros problemas como o aumento do risco de diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), esteatose hepática não-alcoólica (EHNA), resistência insulínica (RI), hipertensão arterial sistêmica (HAS), dislipidemia e aterosclerose. A interação entre essas patologias é denominada síndrome metabólica (Wree, Kahraman et al. 2011, Ahima 2014). Na obesidade, ocorre um aumento do tamanho e número das células adiposas, aumentando a massa total de tecido adiposo. Essas células adiposas são denominadas de adipócitos, que armazenam triacilglicerol (TAG) provenientes da ingestão alimentar excessiva (Ahima 2014).

O tecido adiposo branco (TAB), inicialmente reconhecido como órgão armazenador de energia, é atualmente conceituado como um órgão metabolicamente ativo de natureza endócrina e secretora desde a descoberta da leptina (Zhang, Proenca et al. 1994). Adipócitos hipertrofiados secretam mais leptina que promovem um quadro de resistência à ação desse hormônio, denominado de resistência à leptina. Além da perda do controle da saciedade, o indivíduo perde a regulação negativa que a leptina exerce sobre a secreção de insulina no período pós-prandial. Logo, o indivíduo cursa com hiperleptinemia e hiperinsulinemia (Kieffer and Habener 2000). Esta última favorece o acúmulo de TAG nos adipócitos, os quais com o passar do tempo esgotam a sua capacidade de estocar lipídios e desviam o excesso de ácidos graxos livres (AGL) para armazenamento ectópico em órgãos como o fígado, pâncreas, coração e músculo (Gustafson and Smith 2015).

Uma estratégia viável para enfrentar a obesidade e suas alterações metabólicas é melhorar o gasto de energia (EE) estimulando a termogênese adaptativa (Peirce, Carobbio et al. 2014). O EE engloba três elementos: os obrigatórios (para manter o funcionamento normal de células e órgãos), a atividade física e a termogênese adaptativa (tremor ou não tremor) (Lowell and Spiegelman 2000). A termogênese de não tremor, foi considerada uma

característica exclusiva do tecido adiposo marrom (TAM), devido seu potencial para dissipar o excesso de consumo de energia. No entanto, as evidências recentes demonstram que a expressão da proteína desacopladora 1 (UCP1), conhecida como termogenina, juntamente com um perfil de expressão de genes semelhantes aos adipócitos marrons, induz o tecido adiposo branco subcutâneo (TABs) a adquirir características do TAM, caracterizando o terceiro tipo de adipócitos bege ou castanhos (Spiegelman 2013, Wu, Cohen et al. 2013).

Os adipócitos do tipo bege foram identificados recentemente no TABs de humanos e roedores (Enerback 2009, Ishibashi and Seale 2010). Apesar de estar localizado entremeadado ao TABs, os adipócitos bege se assemelham a histologia e função dos adipócitos marrons: adipócitos multiloculares com maior número de mitocôndrias e atividade termogênica (Shabalina, Petrovic et al. 2013). As observações recentes de que os humanos adultos possuem adipócitos marrons com atividade termogênica relevante desafiam as abordagens que visam o controle da obesidade por estímulo do adipócito bege (Nedergaard, Bengtsson et al. 2007, Ishibashi and Seale 2010).

Neste contexto, os bloqueadores dos receptores da angiotensina (BRA) amplamente prescritos como anti-hipertensivos promovem efeitos pleiotrópicos comuns em modelos de obesidade induzidos por dieta, tais como: reduzir a massa corporal (MC) e melhorar o controle glicêmico (Souza-Mello, Gregorio et al. 2010, Zhao, Chan et al. 2016). A manipulação farmacológica do sistema renina angiotensina (SRA) reduz a adiposidade através de maior gasto de energia e expressão de UCP1 no TAM (Araki, Masaki et al. 2006, Young, Morgan et al. 2015). A Losartana, mostrou recentemente efeitos anti-diabéticos e redução do ganho de MC em camundongos obesos induzidos por dieta (Smith, Hindmarch et al. 2014), embora o impacto sobre a termogênese de não tremor permaneça sem grandes esclarecimentos.

O pâncreas é um dos órgãos mais afetados pela lipotoxicidade (van Raalte, van der Zijl et al. 2010). Estudos prévios relatam que a alimentação com alto teor de gordura causa uma hipertrofia compensatória das ilhotas pancreáticas como tentativa de manter valores de glicose normais no sangue as custas da hiperinsulinemia (Souza-Mello, Gregorio et al. 2010, Janikiewicz, Hanzelka et al. 2015). À medida que a lipotoxicidade se torna crônica, ocorre a intolerância à glicose e, nesta fase, as ilhotas pancreáticas apresentam vias metabólicas alteradas, além de um desarranjo estrutural (Del Guerra, Lupi et al. 2005, Souza-Mello, Gregorio et al. 2011). Essas alterações ameaçam a sobrevivência das ilhotas pancreáticas, que tendem a tornar-se disfuncionais devido a uma forte demanda por síntese de insulina e glucagon (Cerf 2007).

A RI precede o início do DM2 em pelo menos dez anos, durante esse período, a ilhota pancreática sofre uma série de remodelamentos estrutural, funcional e metabólico. A expressão do fator homeobox pancreático-duodenal 1 (PDX1) na ilhota é essencial para induzir a expressão adequada da glicocinase (GK) e do transportador de glicose 2 (GLUT2), que medeia a detecção e absorção de glicose assegurando a função das células beta e a preservação das ilhotas (Cerf 2007, Stitzel, Kycia et al. 2015).

O uso dos BRAs desencadeia efeitos pleiotrópicos na estrutura pancreática e na homeostase de glicose (Souza-Mello, Gregorio et al. 2010, Zhao, Chan et al. 2015). A inibição do receptor de angiotensina tipo 1 (AT1R) no pâncreas endócrino favorece as ações do receptor de angiotensina tipo 2 (AT2R), que parece causar a preservação das ilhotas (Shao, Zucker et al. 2013). Além de um melhor acoplamento entre a detecção de glicose e a absorção por células beta, os efeitos antiapoptóticos e maior vascularização das ilhotas desempenham um papel importante na sua manutenção (Bonora 2008). Neste contexto, ao contrário da losartana (um BRA puro), a telmisartana é também ativado parcialmente pelo receptor agonista proliferador de peroxisoma (PPAR) gama, o que sugere efeitos benéficos aditivos sobre a morfologia e a fisiologia das ilhotas (Bhatia and Viswanathan 2006, Younis, Oron et al. 2012).

Baseado no pressuposto acima, o presente estudo realizado em camundongos teve como objetivo investigar a morfofuncionalidade do TABs na transdiferenciação de adipócitos bege com foco na expressão de genes termogênicos e avaliar a estrutura do pâncreas em relação a detecção de glicose, apoptose e vascularização das ilhotas. Inicialmente o objetivo foi induzir a obesidade e RI, posteriormente, avaliar os efeitos de um período de tratamento usando um BRA puro (losartana) e um BRA agonista parcial PPAR-gama (telmisartana). Nesse contexto, enfatiza-se a relevância do estudo, uma vez que a obesidade esta associada a uma serie de comorbidades associadas e os tratamentos propostos podem atenuar esses fatores, contribuindo para uma melhora crescente da incidência de DM2 e HAS.

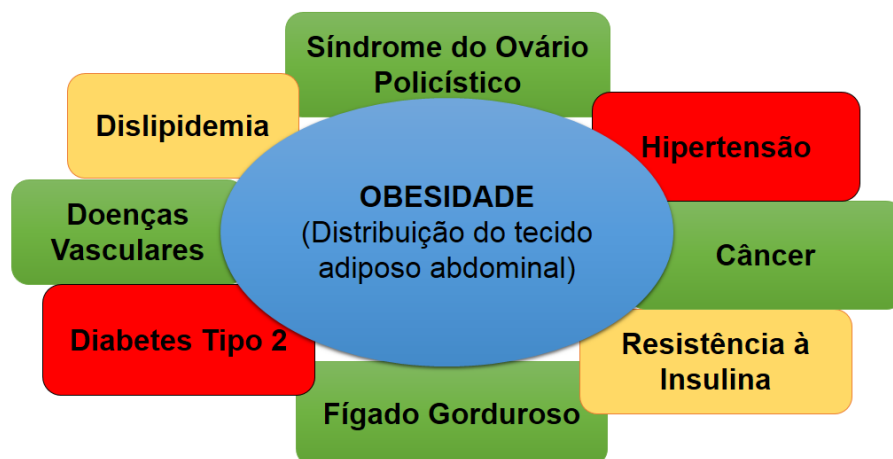
1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Síndrome metabólica

A síndrome metabólica representa um grupo de fatores de risco cardiometabólico progressivo e crônico, que engloba além da obesidade central, um prejuízo na tolerância à glicose, DM2, dislipidemia com aumento das concentrações plasmáticas de triglicerídeos, diminuição de lipoproteína de alta densidade (*high density lipoprotein*, HDL) e HAS (Alberti, Zimmet et al. 2006, Reaven 2011).

A presença de síndrome metabólica está associada a um risco aumentado de eventos cardiovasculares e mortalidade. A patogênese da síndrome metabólica não é conhecida, mas parece haver três categorias etiológicas potenciais: dislipidemia, RI e adiposidade central, além de uma série de fatores independentes que medeiam componentes específicos da síndrome metabólica, Figura 1 (Grundy, Brewer et al. 2004, Alberti, Zimmet et al. 2006, Grundy 2016).

Figura 1 - Doenças associadas à Síndrome Metabólica e suas complicações secundárias



Legenda: A Obesidade e suas comorbidades, onde a obesidade atua como potencializador das demais patologias associadas.

Fonte: a autora, 2017.

O tratamento para adultos do programa nacional de educação contra o colesterol (NCEP-ATP III) e a Federação Internacional de Diabetes formularam definições para a síndrome metabólica.

O NCEP-ATP III coloca como necessário a presença de três entre cinco dos fatores de risco listados abaixo para que o diagnóstico de síndrome metabólica possa ser feito (Expert Panel on Detection and Treatment of High Blood Cholesterol in 2001):

→Obesidade central: circunferência da cintura \geq a 88 cm na mulher e \geq 102 cm no homem;

→HAS: pressão arterial sistólica \geq 130 e ou pressão arterial diastólica \geq 85 mmHg;

→Glicemia alterada (glicemia \geq 110 mg/dL) ou diagnóstico de diabetes (em laboratórios de análises plasmáticas já considera-se 99 mg/dL como valor de corte);

→Triglicerídeos \geq 150 mg/dL;

→HDL colesterol \leq 40 mg/dL em homens e \leq 50 mg/dL em mulheres.

A federação internacional de diabetes publicou critérios que se assemelham ao anterior, entretanto, prevê a obrigatoriedade da presença do critério de cintura abdominal, conforme as raças. Essa classificação considera a obesidade abdominal mais fortemente correlacionada com a RI do que os outros critérios. Caso o índice de MC for >30 kg/m², a obesidade central pode ser admitida e a circunferência da cintura não precisa ser medida (International Diabetes Federation Guideline Development 2006).

A síndrome metabólica está se tornando mais comum devido ao aumento das taxas de obesidade entre os adultos. No futuro, a síndrome metabólica pode ultrapassar o tabagismo como principal fator de risco para doenças cardiovasculares. Controlar com sucesso a síndrome metabólica requer esforço a longo prazo, e é possível prevenir ou postergar, principalmente com mudanças de estilo de vida¹.

À luz do exposto, abaixo será abordado os principais fatores de riscos relacionados a síndrome metabólica destacando assim a sua gravidade e importância para estudo.

¹National Institutes of Health, Health Topics, Metabolic Syndrome; Disponível em: <https://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/ms>, acesso em 13.09.2017.

1.2 Obesidade

Nas últimas décadas, as doenças crônicas têm recebido atenção especial devido ao seu impacto na população mundial, visto que a farta nutrição atual aliada a um estilo de vida sedentário torna-se cada vez mais comum entre crianças e adultos sobretudo em idade reprodutiva (Alberti, Zimmet et al. 2006, Cantiello, Cicione et al. 2015).

A OMS, define a obesidade e o excesso de peso como acúmulo anormal ou excessivo de gordura que apresenta um risco para a saúde². O mecanismo básico de desenvolvimento é uma condição de balanço energético positivo, no qual ocorre um desequilíbrio entre a ingestão e o gasto energético, sendo o excesso de energia estocado na forma de gordura³. Segundo a OMS, em 2014, mais de 1,9 bilhões de adultos tinham sobrepeso e mais de meio bilhão eram obesos, além disso, 2,8 milhões de pessoas morrem por ano como resultado de sobrepeso ou obesidade⁴.

Com base na Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica, na região sudeste 50,45% dos adultos apresentam excesso de peso⁵. A obesidade constitui uma ameaça importante para a saúde pública nacional e mundial em termos de prevalência, incidência e carga econômica, por representar um fator de risco ou marcador para uma série de doenças crônicas com efeitos adversos na saúde em geral (Tremmel, Gerdtham et al. 2017). Em um estudo conduzido em humanos, foi demonstrado que a obesidade foi associada a um aumento da prevalência de DM2, doença da vesícula biliar, doença arterial coronariana, HAS e dislipidemia (Deng, Shivappa et al. 2017).

Mais do que apenas uma consequência de escolhas de estilo de vida, a obesidade é uma doença complexa, poligênica, multifatorial, crônica e resistente a muitas formas de tratamento (Garvey 2013). Além dos fatores bem conhecidos que levam à obesidade, já previamente mencionados, há vários fatores a serem considerados. Alguns fatores que contribuem incluem os distúrbios endócrinos, a epigenética, o aumento da idade materna, maior fecundidade entre pessoas com maior adiposidade, qualidade de sono comprometida,

²Organização Mundial de Saúde (OMS), *Health topics, Obesity*. Disponível em: <http://www.who.int/topics/obesity/en/>, acesso em 08.06.2017.

³Organização Mundial de Saúde (OMS), *Obesity and overweight*. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>, acesso em 13.09.2017.

⁴Organização Mundial de Saúde (OMS), *Obesity*. Disponível em: <http://www.who.int/features/factfiles/obesity/en/>, acesso em 13.09.2017.

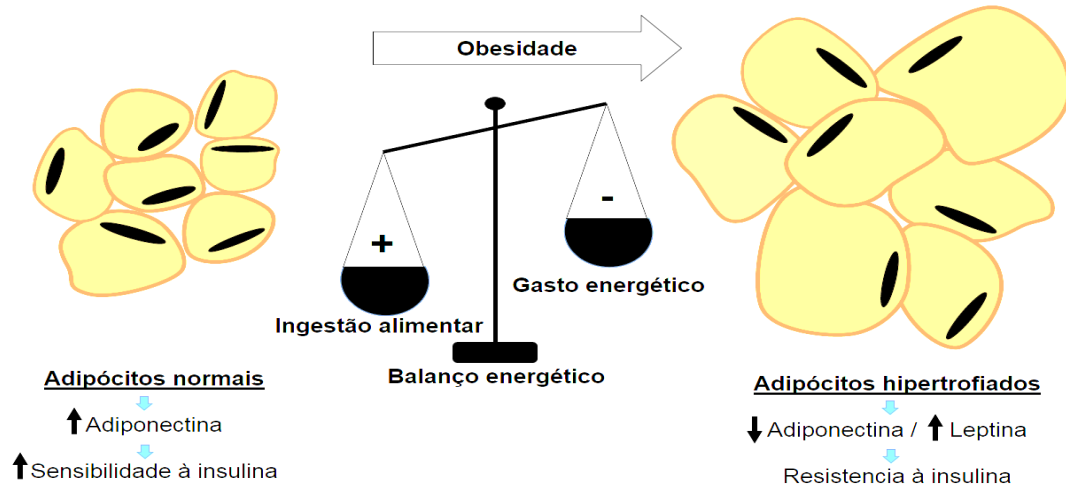
⁵Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO), Científico, Mapa da obesidade. Disponível em: <http://www.abeso.org.br/atitude-saudavel/mapa-obesidade>, acesso em 14.09.2017.

iatrogênese farmacêutica, redução da variabilidade da temperatura ambiente, efeitos intrauterinos e intergeracionais (Ornellas, Mello et al. 2013, Graus-Nunes, Dalla Corte Frantz et al. 2015, Tremmel, Gerdtham et al. 2017).

Na obesidade, os depósitos de tecido adiposo são submetidos a hipertrofia extensa, com expansão dos compartimentos viscerais do tecido adiposo sendo um forte preditor para o desenvolvimento da RI (Pirola and Ferraz 2017). O tecido adiposo é um órgão endócrino que secreta adipocinas que atuam na homeostase da glicose, regulação da pressão arterial, angiogênese, inflamação, sensibilidade à insulina e na regulação do balanço energético através do controle da saciedade (Kim and Moustaid-Moussa 2000, Rasouli and Kern 2008, Olefsky and Glass 2010, Ouchi, Ohashi et al. 2012).

A hipertrofia do tecido adiposo promove a redução do fluxo sanguíneo com resultante hipóxia do tecido, inflamação e infiltração de macrófagos. Os adipócitos hipertrofiados secretam leptina em excesso, a qual produzirá resistência à leptina e, em longo prazo, resistência à insulina por desregulação do eixo adipoinsular (Vickers, Reddy et al. 2001, Goossens 2008). Ocorre ainda limitação na capacidade do tecido adiposo de secretar uma importante adipocina anti-inflamatória, a adiponectina. Esta atua como um potente sensibilizador endógeno da insulina (Berg, Combs et al. 2002). A perda ponderal e/ou utilização de alguns agentes farmacológicos estimulam a adipogênese de forma a substituir células adiposas hipertrofiadas por adipócitos jovens, menores e com maior capacidade de produzir adiponectina e, por isso, mais sensíveis à ação da insulina (Souza-Mello, Gregorio et al. 2010). A figura 2 resume as principais adaptações do tecido adiposo branco com o progressivo ganho de peso.

Figura 2 – Principais alterações morfológicas e funcionais do TA no desenvolvimento da obesidade



Legenda: Balanço energético positivo com aumento da ingestão energética e redução do gasto, ocasionando obesidade.

Fonte: a autora, 2017.

1.3 Diabetes

O diabetes é uma das principais emergências de saúde global do século XXI. A cada ano mais pessoas vivem com esta condição, o que pode levar a complicações ao longo da vida. Atualmente, 415 milhões de adultos têm diabetes e 318 milhões de adultos com tolerância à glicose alterada apresentam risco elevado de desenvolver a doença no futuro. Muitos países não estão conscientes do impacto socioeconômico, esta incompreensão é um empecilho para estratégias de prevenção mais eficazes. Um em cada dois adultos com diabetes não está diagnosticado e a prevalência é maior em homens que residem em regiões urbanas. Com base na Federação Internacional de Diabetes de 2015, no Brasil havia 14,3 milhões de indivíduos diabéticos e 5 milhões de adultos morreram de diabetes no mundo⁶(International Diabetes Federation Guideline Development 2014).

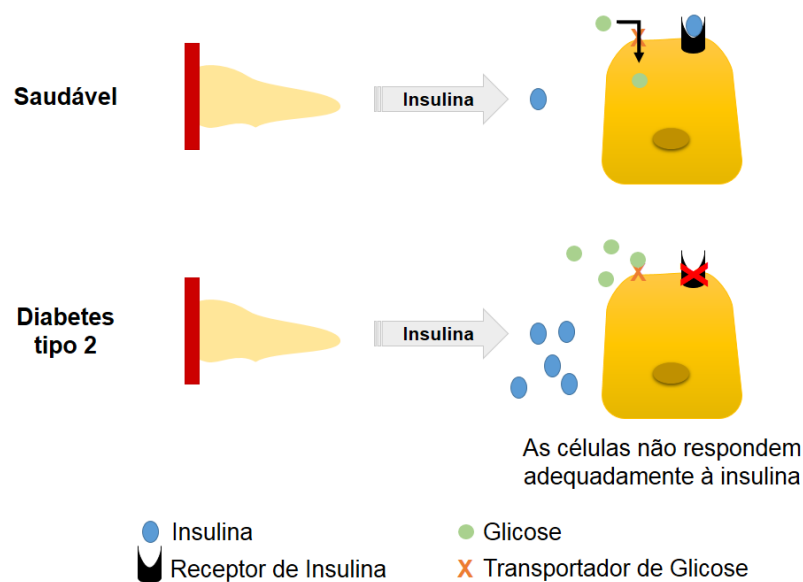
O diabetes tipo 1 (DM1) é uma doença crônica caracterizada pela destruição parcial ou total das células beta das ilhotas pancreáticas, resultando na incapacidade progressiva de produzir insulina. Clinicamente os sintomas só aparecem após a destruição de pelo menos

⁶International Diabetes Federation (IDF), *Epidemiology & research, Atlas of the DIABETES Of IDF Seventh Edition* (2015). Disponível em: <https://www.idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas/13-diabetes-atlas-seventh-edition.html>, acesso em 14.09.2017.

80% da massa de ilhotas. Contudo, neste tópico da revisão iremos abordar o DM2 que representa de 90% a 95% dos casos e caracteriza-se por resistência à ação da insulina e disfunção secretória das células beta pancreáticas. A figura 3 demonstra como a insulina atua nas células do pâncreas saudável e em um pâncreas com DM2.

A etiopatogênese e a fisiopatologia do DM2 são complexas e envolvem componentes genéticos e ambientais que se interrelacionam de maneira ainda pouco conhecida. Dentre os fatores ambientais determinantes, destaca-se a obesidade, particularmente, o acúmulo de gordura visceral, cujo comportamento metabólico difere da gordura subcutânea (Kahn, Hull et al. 2006).

Figura 3 –Atuação da insulina atua na célula de um pâncreas saudável e um pâncreas DM2



Legenda: No pâncreas saudável, a insulina consegue se ligar ao seu receptor permitindo que a glicose entre na célula. No DM2, as células não respondem adequadamente à insulina produzida causando um prejuízo no transporte interno da glicose.

Fonte: A autora, 2017.

A denominação de glicemia de jejum alterada e tolerância à glicose diminuída, são atribuídos a uma combinação de resistência à insulina e disfunção de célula beta pancreáticas. Atualmente três critérios são aceitos para o diagnóstico de diabetes *mellitus* com utilização da glicemia, Tabela 1 (SBD 2016).

Tabela 1 - Valores de glicose plasmática (em mg/dL) para diagnóstico de diabetes *mellitus* e seus estágios pré-clínicos

Categoria	Jejum	2h após 75g de glicose
Glicemia normal	<100	< 140
Tolêrancia à glicose diminuída	>100 a < 126	≥ 140 a < 200
Diabetes <i>mellitus</i>	≥126	≥ 200

Fonte: adaptado da diretriz de 2014-2015 da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD)(SBD 2016).

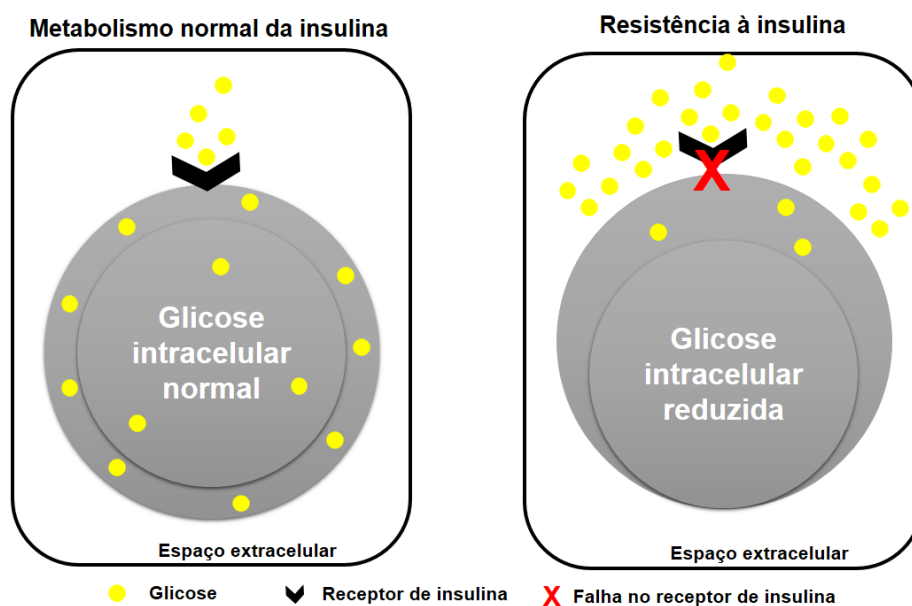
Na vigência de qualquer um dos parâmetros alterados descritos anteriormente é confirmado o diagnóstico de pré-diabetes. Pré-diabetes é definido pela presença de glicemia de jejum prejudicada e/ ou perda de tolerância à glicose. Com base na *National Health and Nutrition Examination Survey* (2005 a 2006), 35% dos adultos com mais de 20 anos de idade tinham pré-diabetes e estima-se que 70% destas pessoas podem desenvolver DM2 durante suas vidas (Deng, Shivappa et al. 2017). Atualmente, a Sociedade Brasileira de Diabetes preconiza como critérios para diagnóstico de pré-diabético e risco aumentado de diabetes a glicemia de jejum entre 100-125 mg/dL (antigamente denominada “glicemia de jejum alterada”) e glicemia de 2 horas após sobrecarga com 75g de glicose entre 140-199 mg/dL (antigamente denominada “tolêrancia à glicose diminuída”) (SBD 2017).

Nas últimas três décadas, dados clínicos demonstraram que o diabetes é uma das principais causas de cardiomiopatia diabética e insuficiência cardíaca (Kain and Halade 2017). Para a prevenção do DM2, recomenda-se a intervenção em indivíduos pré-diabéticos com mudanças no estilo de vida, modificações dos hábitos alimentares, orientações para perda ponderal com redução de 5% a 10% do peso corporal em casos de sobrepeso ou obesidade, bem como a prática de atividade física regular por pelo menos 150 minutos por semana (SBD 2017). Além disso, em um ensaio clínico foi demonstrado que o diabetes é um fator de risco independente para complicações cardiovasculares tanto em homens como em mulheres (Kain and Halade 2017).

1.4 Resistência à insulina

Por definição, a RI é um estado de resposta reduzida a níveis normais de insulina, conforme a figura 4. Aparece como um fator central e determinante da associação da obesidade com o DM2, caracterizando a síndrome metabólica (Lebovitz 2001).

Figura 4 - Metabolismo normal versus resistência à insulina



Legenda: As células dependentes de insulina captam a glícose de maneira eficiente causando redução da glícose que passa a ser utilizada como fonte de energia. Na resistência à insulina (RI), ocorre basicamente falha das células-alvo em reconhecer a insulina. Nessa falha, as células deixam de captar a glícose circulante de maneira eficiente causando o aumento da glícose que passa a ser pouco utilizada e em seu lugar passa a utilizar gorduras e proteínas como fonte de energia. A causa da RI é desconhecida, acredita-se que uma das origens possa ser o defeito e/ou falta de receptores de insulina.

Fonte: A autora, 2017.

Desde a descoberta da insulina em 1921, em síntese, a insulina é um hormônio polipeptídico anabólico essencial, cuja produção ocorre nas células beta pancreáticas e é ativada pelo aumento dos níveis circulantes de glícose e aminoácidos após as refeições (Avruch 1998). Em geral, seus efeitos metabólicos incluem: aumento da captação periférica de glícose, principalmente pelo tecido muscular e adiposo; aumento da síntese e inibição da degradação de proteínas; bloqueio da produção hepática de glícose (gliconeogênese e glicogenólise), redução da lipólise, estímulo da lipogênese nos adipócitos, crescimento e diferenciação celular, entre outros mecanismos (Polonsky, Given et al. 1988).

A manutenção da homeostase da glicose é controlada por processos fortemente relacionados como: a secreção de insulina e glucagon pelas ilhotas pancreáticas, a captação de glicose pelos tecidos esplâncnicos (fígado e intestino) e periféricos (músculo e tecido adiposo branco); e a produção de glicose hepática (Bugianesi, McCullough et al. 2005).

A RI parece ser uma característica pancreática precoce, esse estado RI pode ter início anos antes do diagnóstico de DM2 (Harris and Eastman 2000). A hipertrofia das ilhotas e hipersecreção de insulina surge para compensar o estado de resistência e promover valores normais de glicemia num primeiro momento. Contudo, a concentração de glicose plasmática continua a aumentar, uma vez que a captação de glicose por tecidos periféricos (tecido adiposo branco e músculos) reduz e a produção de glicose hepática (gliconeogênese) aumenta (Velloso, Folli et al. 2006).

O trabalho exaustivo das ilhotas pancreáticas progride para deterioração progressiva da função das células beta devido à incapacidade de sustentar a taxa aumentada de secreção de insulina, de modo que, 50% da função das ilhotas no momento do diagnóstico de hiperglicemia já estão comprometidas e o quadro de intolerância oral a glicose já está instalada (Yoon, Ko et al. 2003, DeFronzo and Abdul-Ghani 2011). Esta hiperglicemia cronicamente, causa um efeito prejudicial pró-inflamatório e pró-oxidativo, denominado glicotoxicidade (Bonora 2008).

1.5 Hipertensão

HAS é uma condição clínica multifatorial comumente referida como pressão elevada exercida na parede do vaso (O'Donnell, Ridker et al. 1997). A OMS define a hipertensão como pressão sistólica superior a 140 mmHg e/ou uma pressão diastólica superior a 90 mmHg e estima-se que 40% dos adultos com mais de 25 anos podem ser hipertensos em todo o mundo (Organization 2013).

No Brasil, a HAS atinge 36 milhões de indivíduos adultos, contribuindo direta ou indiretamente para 50% das mortes por doença cardiovascular. As doenças cardiovasculares são ainda responsáveis por alta frequência de internações, com custos socioeconômicos elevados. Em 2013, dados do Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde (SUS) apontam significativa redução da tendência de internação por HAS (Malachias, Plavnik et al. 2016). A maioria dos pacientes com HAS possui outros fatores de risco,

incluindo anormalidades lipídicas, intolerância à glicose ou diabetes, história familiar de eventos cardiovasculares precoce, obesidade e tabagismo.

A HAS pode ser classificada em: hipertensão, indivíduos com pressão arterial sistólica entre 120-129 mmHg e pressão arterial diastólica menor 80 mmHg (a princípio o tratamento medicamentoso não é indicado, inicialmente são orientados a mudar o estilo de vida integrando a prática de exercícios regulares e hábitos alimentares saudáveis, entre outros); hipertensão estágio 1, indivíduos com pressão arterial sistólica entre 130-139 mmHg ou pressão arterial diastólica entre 80-89 mmHg (nesta condição o tratamento deve ser iniciado quando as mudanças no estilo de vida não foram eficazes) ou hipertensão estágio 2, indivíduos com pressão arterial sistólica acima 140 mmHg ou pressão arterial diastólica acima 90 mmHg (o tratamento farmacológico deve ser iniciado imediatamente após o diagnóstico, geralmente com uma combinação de duas drogas) (PK 2017, Webera, et al. 2014).

A hipertensão sustentada causa alterações físicas nos vasos sanguíneos e na parede cardíaca sendo um fator de risco bem conhecido para hipertrofia dilatada, insuficiência cardíaca e acidente vascular cerebral (AVC). Cerca de 50% dos AVCs isquêmicos são causados por hipertensão com alto risco para AVC hemorrágico. A relação do risco de infarto do miocárdio dobra quando a pressão sistólica é de 140 mmHg e a pressão diastólica é de 94 mmHg (O'Donnell, Ridker et al. 1997). A doença arterial coronariana é consequência da inflamação, dislipidemia e diabetes e é agravada pela HAS. A insuficiência cardíaca congestiva, angina e infarto do miocárdio são comuns as consequências da obesidade e um índice de massa corporal (IMC) significativamente elevado o que aumenta o risco de infarto do miocárdio fatal (Meldrum, Morris et al. 2017).

1.6 Sistema renina-angiotensina

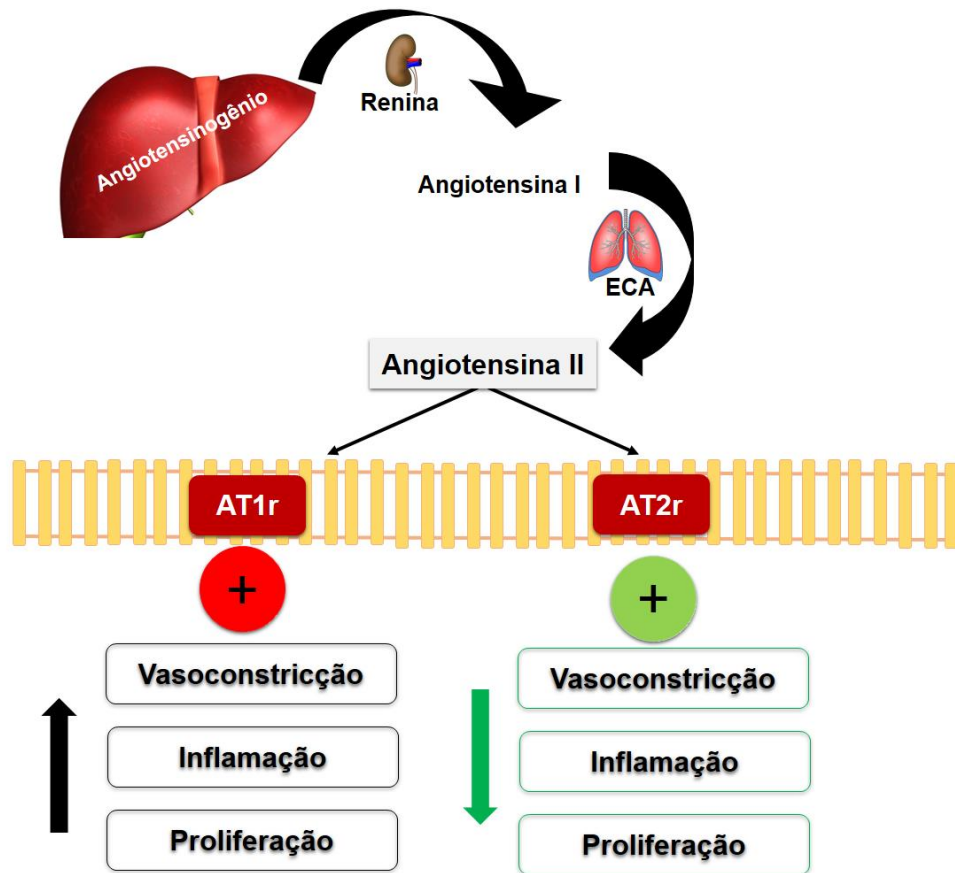
Relatos iniciais sobre o sistema renina angiotensina (SRA) foram descritos por Tiegerstedt e Bergman em 1898. Contudo, apenas nas décadas de 40 e 50 o seu reconhecimento e sua função foram demonstrados. Inicialmente, o SRA foi pensado como um sistema endócrino no qual o rim influenciaria na regulação do sistema cardiovascular e no balanço hidroeletrolítico (Dzau and Pratt 1986, Atlas 2007).

Atualmente, sabe-se que o SRA desempenha um papel importante na regulação da pressão arterial, equilíbrio hidroeletrolítico, estruturação e função cardiovascular.

Fisiologicamente, a maior parte das suas ações é exercida pela angiotensina II (ANG II), um peptídeo biológico relacionado com a etiologia da hipertensão arterial, outras formas de doenças cardiovasculares e renais (Peach 1977, Bader M 2008).

No SRA clássico, a formação de ANG II, um octapeptídeo, envolve uma série de sequência de clivagens proteolíticas do angiotensinogênio (proteína derivada dos lóbulos hepáticos que circula como um peptídeo biológico inativo). O angiotensinogênio circulante é convertido em um decapeptídeo denominado angiotensina I (ANG I) através da ação da renina (enzima sintetizada e armazenada sob a forma inativa, denominada pró-renina, nas células justaglomerulares dos rins) que é ativada pela queda da pressão arterial. A renina é o principal limitante da produção de ANG II (Dzau and Pratt 1986). A ANG I é convertida em ANG II através da ação da enzima conversora de angiotensina (ECA, uma metaloprotease de ligação de membrana, predominantemente encontrada no endotélio dos vasos pulmonares). A ECA causa degradação da bradicinina, um potente peptídeo vasodilatador e cardioprotetor que estimula a liberação de outros vasodilatadores importantes, como o óxido nítrico. A ANG II se liga aos AT1R ou AT2R, sendo que o AT1R evidencia as ações clássicas da ANG II, levando ao aumento da atividade do sistema nervoso simpático e resistência vascular periférica, causando liberação de aldosterona suprarrenal, retenção de sódio e água, além de, causar a vasoconstrição e aumento da pressão arterial (Kaschina E and T. 2003, Atlas 2007). A figura 5 mostra um esquema da via do SRA clássico.

Figura 5 – SRA clássico e seus efeitos conhecidos mediado pelos receptores



Legenda: Os receptores AT1 medeiam, além da vasoconstrição, proliferação celular e hipertrofia, bem como o acúmulo de matriz extracelular e efeitos pró-inflamatórios que contribuem para danos vasculares. Aos receptores AT2 são classicamente atribuídos efeitos opostos, o que compensaria as consequências da estimulação do receptor AT1.

Fonte: A autora, 2017.

Alvo constante para o tratamento de doenças cardiovasculares, a hiperatividade do SRA tem sido associada à obesidade e outras comorbidades. Isso faz dos bloqueadores do SRA uma classe de escolha para o tratamento de hipertensão em indivíduos obesos devido aos efeitos pleiotrópicos e cardiovasculares benéficos (de Kloet, Krause et al. 2010).

Evidências sugerem que a intervenção farmacológica do SRA está associada ao atraso no aparecimento do DM2 e uma melhoria na sensibilidade à insulina. Essa melhoria se justifica através de alguns mecanismos, dentre os quais se destacam alterações na função do tecido adiposo, como redução no diâmetro dos adipócitos, restauração da secreção de adipocinas, melhora da função de células beta com redução da inflamação, fibrose e melhora da sensibilidade à insulina no músculo (van der Zijl, Moors et al. 2012).

1.7 Bloqueadores dos receptores de angiotensina II

A busca por medicamentos que atuam no SRA deu origem à classe de anti-hipertensivos denominados bloqueadores dos receptores de angiotensina II (BRAII) que promovem bloqueio mais específico do SRA pela inibição das ações deletérias da ANG II a nível de receptor (AT1R), independentemente da via pela qual a ANG II foi formada (SILVA 2010).

O mecanismo de ação dos BRAII é através do bloqueio do AT1R que em oposição inibe a contração da musculatura lisa vascular ocasionada pela ANG II, acarretando vasodilatação, excreção de sódio e redução da atividade simpática. Uma vez que somente bloqueiam os AT1R, não interferem nas respostas crônicas dos AT2R (e outros) que poderiam resultar em aumento da renina ou liberação de angiotensina (Ramos and Casali 2012).

Para a realização deste estudo os fármacos de escolha foram a losartana e a telmisartana e serão abordados a seguir.

1.7.1 Losartana

A losartana potássica foi o primeiro fármaco antagonista dos receptores da angiotensina II (bloqueador do AT1R, também conhecidos como BRAII) a ser disponibilizado no mercado, sendo inicialmente desenvolvido pela empresa Merck, e comercializado sob o nome Cozaar® (van Zwieten 2006, Goodman LS 2012). É indicado para o tratamento de hipertensão e para o tratamento de insuficiência cardíaca (quando o tratamento com ECA não for mais adequado para o paciente)7.

Após administração oral é rapidamente absorvida, atingindo a máxima concentração após uma ou duas horas. Sofre metabolismo de primeira passagem no fígado, formando carboxílico ativo e outros metabólitos inativos. A biodisponibilidade sistêmica é de aproximadamente 33%, com concentrações plasmáticas atingidas de uma a quatro horas. Seu tempo de meia-vida é de aproximadamente seis horas com excreção via renal e biliar (Goodman LS 2012).

A losartana liga-se seletivamente ao AT1R e não se liga ou bloqueia outros receptores de hormônios ou canais iônicos importantes na regulação cardiovascular. A losartana bloqueia

as ações fisiológicas relacionadas à ANG II e não apresenta efeitos agonistas. Além disso, não inibe a ECA (cininase II), a enzima que degrada a bradicinina. Conseqüentemente, a potencialização dos efeitos mediados pela bradicinina ou o desenvolvimento de edema não estão associados diretamente ao bloqueio do AT1R pela losartana⁷.

A dose usual varia de 25 a 100 mg, tomado uma vez ao dia para a maioria dos pacientes. Em geral é bem tolerada e seus efeitos colaterais têm sido de natureza leve e transitória, como tontura e hipotensão, não sendo requerida a descontinuação da terapia (Goodman LS 2012). Alguns bloqueadores do AT1R possuem propriedades agonista parcial ativado pelo PPAR-gama, sendo denominados moduladores dos PPARs, porém, não é descrito que a losartana apresente efeitos como agonista PPAR (Kintscher 2012, Perlstein, Henry et al. 2012).

1.7.2 Telmisartana

O fármaco telmisartana também faz parte da classe de BRAII e é desenvolvido pela empresa Boehringer Ingelheim, com o nome comercial de Micardis®. Sua principal indicação é para tratamento de hipertensão arterial⁸.

A telmisartana tem afinidade elevada pelos AT1R, o que evita a ligação da ANGII a esse receptor e com isso causa a inibição das ações conhecidas da ANGII. Além disso, a telmisartana reduz os níveis plasmáticos de aldosterona, não inibe a renina plasmática e nem bloqueia os canais iônicos. De forma semelhante, a losartana não causa inibição da ECA, e, logo, não se espera potencializar os efeitos adversos da bradicinina mencionados anteriormente. A dose usual varia de 40-80 mg, sua ação tem início gradual sendo evidente em três horas e o efeito anti-hipertensivo máximo geralmente é atingindo após 4-8 semanas do início do tratamento⁸(van Zwieten 2006).

A telmisartana vem se diferenciando dos demais BRAII não apenas no controle da hipertensão, mas também das comorbidades associadas devido à ação de agonista parcial PPAR-gama. A ativação do PPAR-gama desempenha um papel importante na regulação de insulina. A telmisartana apresenta característica lipofílica (tem afinidade e é solúvel em lipídios), que permite penetrar no núcleo da célula mesmo em baixas concentrações e, assim,

⁷Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA),Cozaar® (losartana potássica), MSD. Disponível em:http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=7960152015&pIdAnexo=2837802, acesso em 17.07.2017.

⁸ Boehringer Ingelheim. Micardis®. Disponível em: https://www.boehringer-ingelheim.com.br/sites/br/files/documents/bulamicardis_pacienteprofissionaldasaude_24032017.pdf, acesso em 17.07.2017.

ativar o PPAR-gama. Essa ativação do telmisartana é independente do AT1R, o que permite considerá-la sensibilizadora da insulina (Benson, Pershadsingh et al. 2004, Souza-Mello, Gregorio et al. 2010).

1.8 Tecido adiposo

O tecido adiposo foi descrito como um órgão endócrino na década de 1990, após observações da sua relação com a inflamação na obesidade e resistência à insulina (Hotamisligil, Shargill et al. 1993). Capaz de adaptar-se às alterações metabólicas, tais como a restrição alimentar, estresse, sedentarismo e o excesso de energia advindo da alimentação; sua capacidade de liberar as denominadas adipocinas, como fatores de crescimento, hormônios e citocinas, são descritos na literatura (Rodriguez, Ezquerro et al. 2015).

As células do tecido adiposo são denominadas adipócitos, suas características metabólicas principais são a síntese e reserva de energia em forma de triglicerídeos a partir de ácidos graxos denominado lipogênese e a mobilização desta reserva energética quando necessário; os triglicerídeos são utilizados através da liberação de glicerol e ácidos graxos na corrente sanguínea para serem utilizados pelo organismo em resposta a alterações do balanço energético, evento denominado lipólise (Kolditz and Langin 2010).

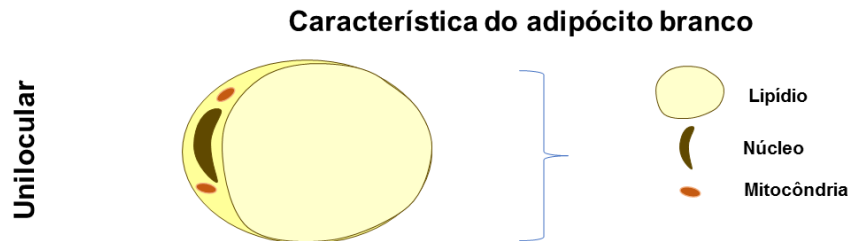
Em seres humanos e em roedores coexistem dois tipos de tecido adiposo, o tecido adiposo branco (TAB) e o tecido adiposo marrom (TAM) no qual suas características serão abordadas adiante (Brito 2012).

1.8.1 Tecido adiposo branco

O tecido adiposo branco (TAB) tem como principal característica uma única gotícula de gordura central (por isso chamado unilocular), cercada por uma pequena quantidade de citoplasma que ocupa grande parte do volume celular, levando a um deslocamento do citosol com suas organelas e do núcleo para a periferia da célula, além de apresentar poucas mitocôndrias (Brito 2012), conforme demonstrado na figura 6. O TAB é composto por dois componentes principais: os adipócitos e a fração vascular estromal (constituente principal de pré-adipócitos, células imunes e fibroblastos); juntos, adipócitos e fração vascular estromal

produzem matriz extracelular para manter a integridade estrutural e funcional do tecido (Divoux and Clement 2011, Wronska and Kmiec 2012).

Figura 6 – TAB com sua característica unilocular



Legenda: O tecido adiposo branco (TAB) é responsável pela reserva lipídica e secreção de adipocinas.
Fonte: A autora, 2017.

O TAB encontra-se em grande quantidade distribuído por todo o corpo em diversos compartimentos localizados, principalmente na região subcutânea (gordura subcutânea, forma uma camada sob a pele) e na cavidade toracoabdominal (gordura visceral, circundando os órgãos internos). Sua principal função é o armazenamento de energia, proteção mecânica (contra choques e traumas), isolante térmico, manutenção da temperatura corporal, auxílio no deslizamento entre vísceras e feixes musculares. (Masoodi, Kuda et al. 2015).

Evidências sugerem que a inflamação tem um papel importante no início e na manutenção da obesidade através da adipogênese (Santos, Fernandes et al. 2012). Durante a inflamação o TAB sofre remodelamento, passando a apresentar hipertrofia e hiperplasia de adipócitos com mudança do fenótipo de macrófagos locais do tipo M2, presentes principalmente em TAB saudável, para o tipo M1, presentes no TAB inflamado e obeso (Fujisaka, Usui et al. 2009).

A resposta inflamatória e a tolerância à glicose em indivíduos obesos leva à secreção de adipocinas (Tilg and Moschen 2006, Wintour and Henry 2006). Diante do papel crucial das adipocinas no processo inflamatório, destacam-se as adipocinas pró-inflamatórias altamente expressas na vigência da obesidade que incluem dentre outros: interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral – alfa (TNF-alfa), leptina e a adiponectina (Pradol 2009).

A adiponectina, possui influência na sensibilidade insulínica e propriedades antiaterogênicas, bem como o TNF-alfa interfere na sinalização de insulina e é uma possível causa da RI. O IL-6, atua como mediador do processo inflamatório e influencia o metabolismo lipídico (Tzanavari, Giannogonas et al. 2010, de Oliveira, Moraes et al. 2015).

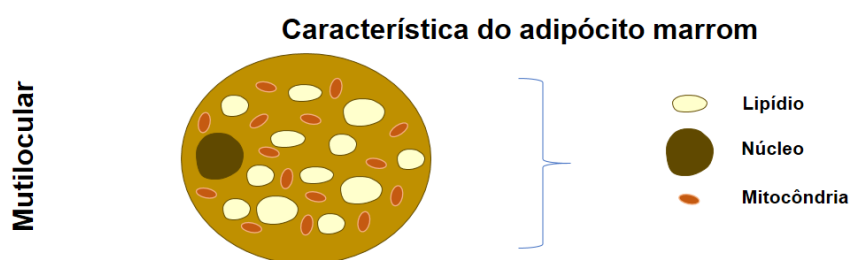
Dentre as adipocinas de caráter anti-inflamatório está a FNDC5/Irisina que foi descrita recentemente como uma adipocina, secretada principalmente pelo TABs (Roca-Rivada, Castelao et al. 2013). O interesse na presença desta proteína deve-se ao fato de que ela representa um marcador para a plasticidade da gordura branca-marrom, fenômeno conhecido como browning, além de estimular consideravelmente a via termogênica do TAM (Bostrom, Wu et al. 2012).

1.8.2 Tecido adiposo marrom

O TAM, descrito como “nem gordura nem carne” no século XVI, tornou-se alvo de importantes descobertas, como a identificação da proteína desaclopadora 1 (UCP1) nas últimas décadas (Cannon and Nedergaard 2004, Richard, Carpentier et al. 2010). As células do TAM, tem origem a partir de células progenitoras de miócitos (células musculares), chamadas de mioblastos, que expressam o fator miogênico 5 positivo (Myf5+) (Richard, Carpentier et al. 2010).

Sua característica principal é a presença de múltiplas gotículas de gordura (multilocular), cercados por um citoplasma perceptível com o núcleo em formato esférico, além de possuir uma grande quantidade de mitocôndrias, figura 7. É especializado na liberação de energia sob a forma de calor, mecanismo conhecido como termogênese adaptativa (Brito 2012). O TAM é encontrado em regiões específicas que compreendem as regiões cervical, supraclavicular, paravertebral, mediastinal e perirrenal em humanos e em regiões interescapular, subescapular, regiões axilar, perirrenal e periaórtica em roedores (Park, Kim et al. 2014).

Figura 7 – TAM e sua característica multilocular



Legenda: O tecido adiposo marrom (TAM) é responsável pela termogênese adaptativa.
Fonte: A autora, 2017.

A termogênese adaptativa do TAM parece ter dois propósitos fisiológicos distintos, um estaria ligado à manutenção da temperatura corporal e o outro à queima do excesso de energia ingerida. No primeiro, temos a termogênese termorregulatória (induzida pelo frio), que visa manter a temperatura em homeostase. A exposição aguda ao frio promove a termogênese através da contração involuntária da musculatura esquelética (termogênese shivering), quando esta torna-se crônica, a dissipação de energia sem tremor se instala no TAM (termogênese non-shivering). No segundo, temos a termogênese metabolorregulatória (induzida por dieta, sempre do tipo non-shivering), cada vez mais estudada, contudo apresenta aspectos ainda pouco esclarecidos (Cannon and Nedergaard 2004). A termogênese adaptativa libera noradrenalina, que ativa receptores adrenérgicos localizados na membrana plasmática dos adipócitos marrons, dentre os subtipos existe o receptor beta 3 adrenérgico (β 3-AR), o mais relevante para a ativação aguda da termogênese (Lafontan and Berlan 1993).

A UCP1, uma proteína situada na membrana interna da mitocôndria, é regulada por estímulos gerados através da sinalização simpática adrenérgica, desencadeando um desacoplamento da cadeia respiratória entre o consumo de oxigênio e síntese de ATP, levando assim à dissipação de energia sob a forma de calor (Langin 2010). A coloração amarronzada do TAM é acarretada por uma elevada presença de mitocôndrias. Além disso, tem sido demonstrado que a UCP1 é um dos principais marcadores para a identificação do TAM (Langin 2010, Rodriguez, Ezquerro et al. 2015). O gene coativador 1 alfa do PPAR-gama (PGC1-alfa) é altamente expresso no TAM e induz à expressão de UCP1, aumentando a capacidade oxidativa mitocondrial, sendo portanto fundamental para a termogênese (Hondares, Rosell et al. 2011).

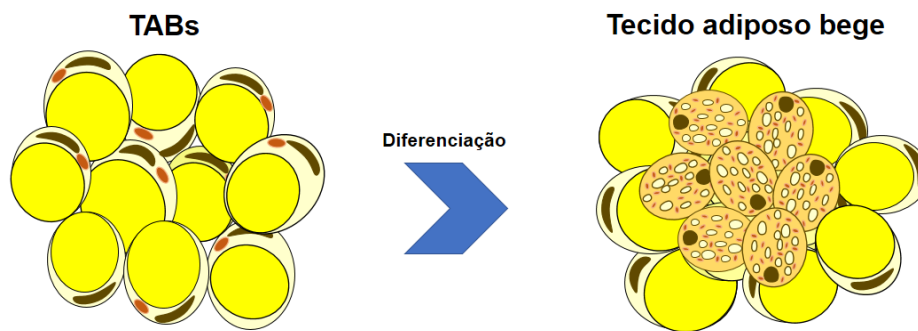
A descoberta de que uma grande fração de humanos adultos apresenta TAM motivou a realização de estudos experimentais que tentem desvendar o papel de agentes indutores da termogênese adaptativa para o controle da obesidade (Nedergaard, Bengtsson et al. 2007).

1.8.3 Tecido adiposo bege

Na década de 80 e 90, experimentos descreveram que o TABs de roedores apresentaram alta proporção na potencialidade de expressão da UCP1 e outros marcadores gênicos característicos do TAM quando comparado ao tecido adiposo branco visceral (Loncar, Afzelius et al. 1988, Cousin, Cinti et al. 1992).

Recentemente foi identificado um terceiro tipo de adipócito, denominado de célula bege, apresentando um fenótipo similar ao TAM (Giralt and Villarroya 2013). O adipócito bege se desenvolve a partir do tecido adiposo branco por processo de transdiferenciação ou por seus precursores (pré-adipócitos beges), a partir de estímulos que estão em processo de descoberta (Spiegelman 2013). Os adipócitos beges se assemelham ao adipócito marrom em termos de capacidade termogênica e padrão de expressão gênica, porém encontram-se situados entremeados em coleções de TABs, conforme a figura 8 (Rachid, Penna-de-Carvalho et al. 2015).

Figura 8 – Tecido adiposo bege



Legenda: TABs de reserva lipídica passando por um processo de diferenciação com foco de tecido adiposo bege termogenicamente ativo.

Fonte: A autora, 2017.

Esse novo adipócito pode gerar benefícios sobre o metabolismo e reduzir o risco de patologias, tais como a obesidade e o DM2 (Ishibashi and Seale 2010, Bartelt and Heeren 2014). Um recente estudo sugere que o fenômeno *browning* (o processo de escurecimento do TAB em tecido adiposo bege) pode ser um novo alvo terapêutico para a redução de patologias como obesidade, porém as investigações translacionais ainda são incipientes (Keipert and Jastroch 2014).

A identificação da célula bege no TAB pode ser comprovada pela marcação de genes típicos do TAM no TABs, tais como genes envolvidos na termogênese (UCP1), biogênese mitocondrial (PGC1-alfa), entre outros (Bostrom, Wu et al. 2012, Wu, Cohen et al. 2013). O PGC1-alfa, co-ativador transcricional que está envolvido na biogênese mitocondrial e na expressão de genes termogênicos, é primordialmente expresso no TAM e encontra-se aumentados na vigência de atividade termogênica (Kleiner, Mepani et al. 2012). Um outro

gene muito importante na caracterização do *browning* é o domínio PR contendo proteína 16 (PRDM16), co-ativador transcricional que caracteriza a linhagem marrom do tecido adiposo (Hondares, Rosell et al. 2011).

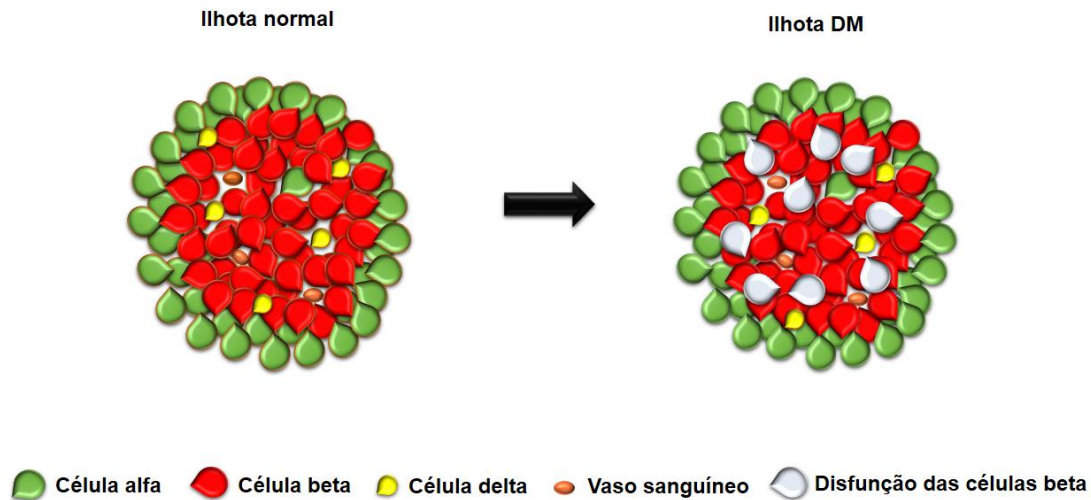
1.9 Pâncreas

O pâncreas humano está localizado na parte superior do abdômen (na altura da segunda vertebra lombar), se estende do duodeno até o baço, por trás do estômago. Anatomicamente, divide-se em quatro partes: cabeça (engloba os vasos mesentéricos superiores), pescoço, corpo e cauda. Todas as partes devem ser consideradas retroperitoneais, exceto a cauda do pâncreas que é coberta pelo peritônio. A cabeça do pâncreas é abraçada pelo duodeno, o ducto biliar comum que atravessa a cabeça do pâncreas e se junta com o ducto pancreático na ampola de Vater para esvaziar a bile no duodeno. A cauda do pâncreas encontra-se no ligamento esplenorrenal e entra no hilo do baço (Eliete Dalla Corte Frantz, Souza-Mello et al. 2015).

A vascularização do pâncreas tem origem na artéria pancreaticoduodenal superior e inferior. Além disso, a artéria esplênica que dá origem a três ramos arteriais importantes: artéria pancreática dorsal, artéria pancreática magna (irriga a parte média do corpo) e artéria pancreática caudal (irriga a cauda). Em roedores, a anatomia do pâncreas é menos bem definida e está imerso no tecido adiposo, contudo esse modelo animal é frequentemente utilizado para estudar a estrutura e função do pâncreas (Eliete Dalla Corte Frantz, Souza-Mello et al. 2015).

A porção endócrina do pâncreas é constituída por um grupo de células, chamadas de ilhotas pancreáticas (ou ilhotas de Langerhans), que consiste em cinco tipos de células diferentes, cada uma das quais é caracterizada pela expressão distinta de um hormônio peptídico específico: glucagon é expresso em células alfa, insulina é expresso em células beta, somatostatina está presente em células delta, o polipeptídeo pancreático é expresso em células PP e a grelina é expresso em células épsilon (Eliete Dalla Corte Frantz, Souza-Mello et al. 2015). A figura 9, demonstra a distribuição das principais células na ilhota pancreática.

Figura 9 – Distribuição das células na ilhota pancreática



Legenda: As células alfa se distribuem preferencialmente na região mais periférica enquanto que as células beta localizam-se mais na região central da ilhota.

Fonte: A autora, 2017.

A disfunção secretória e/ou resistência à ação da insulina pelas células beta pancreáticas são basicamente os dois mecanismos patogênicos do DM2. A maioria dos obesos e RI não desenvolve hiperglicemia. Normalmente, a ilhota pancreática apresenta grande plasticidade e adapta-se à redução da sensibilidade à insulina, aumentando tanto a secreção de insulina como a massa de células beta. A adaptação das células beta à RI parece estar associada ao aumento do metabolismo da glicose, à sinalização por ácidos graxos não esterificados, à ação secretagoga e mitógena da incretina peptídeo similar ao glucagon 1 (GLP1) (M.O.Leal and Voltarelli 2010).

Pacientes com DM2 não apresentam essa resposta adaptativa. A RI associa-se à disfunção das células beta pancreáticas e, portanto, as anormalidades adaptativas das células beta são críticas para o desenvolvimento do DM2. As alterações das células beta pancreáticas no DM2 são funcionais e quantitativas e, deste modo, a redução de 50% da massa de células beta por aumento da apoptose gera 75% da perda de sua capacidade funcional. A taxa de replicação de células beta (neogênese) não é prejudicada em indivíduos DM2 que, no entanto, têm uma taxa aumentada de apoptose. Isso sugere que as estratégias de tratamento para pacientes com DM2 devem incluir agentes que podem atrasar e/ou prevenir a apoptose das células beta (M.O.Leal and Voltarelli 2010, DeFronzo and Abdul-Ghani 2011).

1.9.1 Aspectos morfofuncionais das ilhotas pancreáticas

A insulina, um hormônio hipoglicemiante, controla os níveis pós-prandiais de glicose circulante através de efeitos metabólicos que incluem o aumento da captação periférica de glicose (principalmente tecido muscular e adiposo), estímulo da glicogênese (preservando a glicose estocada para períodos de jejum) e inibição da síntese de glucagon pelas células alfa (interrompendo a produção hepática de glicose via glicogenólise e neoglicogênese) (DeFronzo and Ferrannini 1987). O transporte de glicose através da membrana celular é influenciado pela flutuação da secreção de insulina e mudanças na massa de células beta a longo prazo que podem ser observadas como forma de adaptação às variações sistêmicas da insulina necessárias para a normoglicemia (Valtat, Dupuis et al. 2011).

A obesidade concomitante à RI provoca alterações morfofuncionais que acometem as células alfa e beta do pâncreas com subsequente prejuízo na via de sinalização da insulina (Ahren and Pacini 2005, Cohen, Shamni et al. 2015). Devido ao prejuízo causado por essas comorbidades nas células alfa, ocorre aumento da síntese de glucagon ao mesmo tempo em que há o aumento da secreção de insulina pelas células beta (Ferrannini, Muscelli et al. 2007, Ahren 2009). Essa desregulação na secreção dos hormônios das células alfa e beta ocasionam RI e conseqüente desenvolvimento da intolerância à glicose, que em longo prazo, pode levar ao DM2 (Ahren 2009).

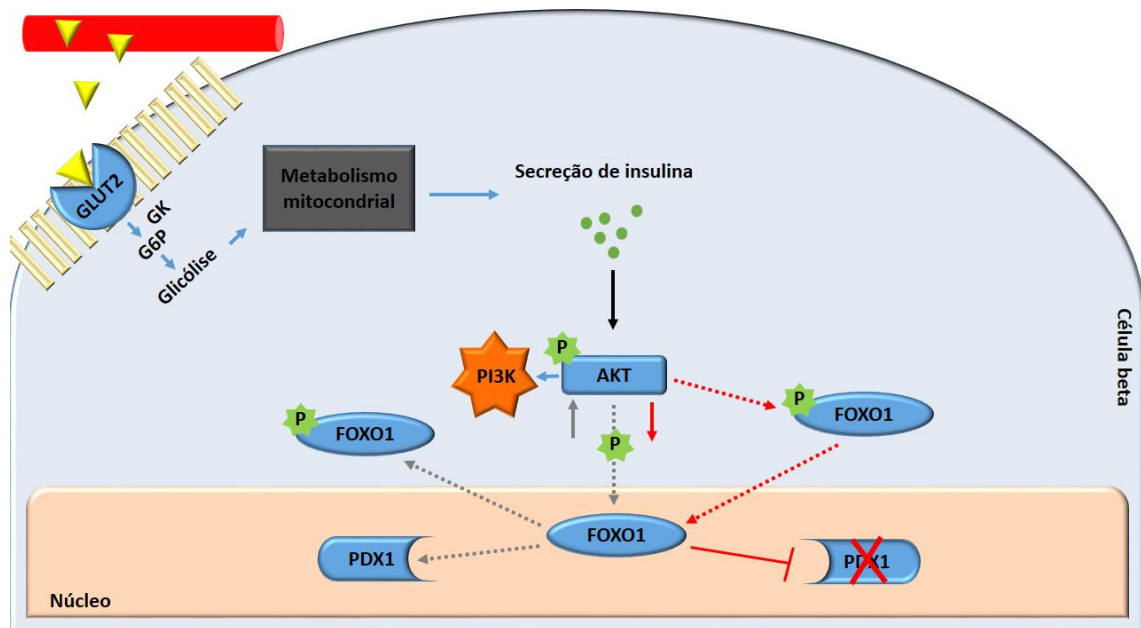
Nas células beta pancreáticas, a insulina ativa a proteína quinase B (AKT, também conhecida como PKB) de forma dependente à ativação da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) (Dickson and Rhodes 2004). Uma vez fosforilada, a proteína AKT regula positivamente o fator de transcrição forkhead 2 (Forkhead Transcription Factor 2 – FOXO2), que por sua vez, inibe o fator de transcrição forkhead 1 (Forkhead Transcription Factor 1 - FOXO1) (Brunet, Bonni et al. 1999, Katoh 2004). Com a expressão diminuída da proteína AKT, a expressão de FOXO2 diminui e o FOXO1 é mais expresso, com conseqüente diminuição do PDX1, caracterizando um estado de disfunção celular (Kitamura, Nakae et al. 2002). O PDX1 é um fator de transcrição-chave expresso em diversos estágios do desenvolvimento do pâncreas e também no processo de diferenciação das células beta pancreáticas (Schwitzgebel, Mamin et al. 2003). A sua expressão está atrelada à preservação da função das células beta pancreáticas, pois em um ensaio clínico foi demonstrado que há diminuição na expressão PDX1 na RI e no DM2 (Yang, Dayeh et al. 2012).

O PDX1 pode ativar nas células beta o gene da insulina, bem como outros genes envolvidos na detecção de glicose e seu metabolismo. Estes genes incluem a glicoquinase (GK) e transportador de glicose 2 (GLUT2), os quais têm sua transcrição aumentada através da ação do GLP1, que aumenta a secreção de insulina estimulada pela glicose através da ativação da monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) (Watada, Kajimoto et al. 1996, Buteau 2008). Através do aumento da expressão do fator de transcrição PDX1, o GLP1 pode promover a expressão do gene da insulina e sua biossíntese (Buteau 2008).

Os GLUTs apresentam 14 isoformas descritas na literatura, contudo, o GLUT2 nas células beta pancreáticas é o principal transportador de glicose através da membrana plasmática e sua inativação genética extingui a absorção de glicose e secreção de insulina estimulada pela glicose (GSIS) (Thorens 2015). A GK serve como um sensor de glicose nas células beta pancreáticas, e, através do reconhecimento da glicose induz a secreção de insulina. Com o aumento dos níveis de glicose circulante durante a fase pós-prandial, a GK é fosforilador principal da glicose. Em oposição à GK, a enzima glicose-6-fosfatase (G6Pase) é inibida. Desta forma, a atividade regular da GK é primordial para a homeostase da glicose durante o período pós prandial(Lenzen 2014).

Em suma, na via AKT/FOXO1, a fosforilação da AKT estimula a captação de glicose para membrana através do transportador GLUT2, que em condições normais inibe a FOXO1 permitindo a transcrição de PDX1. Cabe ressaltar que a FOXO1 inibe a proliferação das células beta pancreáticas através da supressão de PDX1, já que a FOXO1 quando ativa (fosforilada) se transloca para o núcleo, silenciando o PDX1 (Hanada, Feng et al. 2004, Kitamura and Ido Kitamura 2007). Na figura 10 uma breve descrição do esquema descrito anteriormente.

Figura 10 – Via de sinalização AKT/FOXO1 e sua relação com PDX1



Legenda: A seta cheia indica transporte; as setas pontilhadas indicam ações sequenciais de fosforilação/estimulação e a linha interrompida indica inibição. As células beta secretam insulina em resposta ao aumento de pequenas concentrações de glicose no sangue. O GLUT2 e GK atuam como sensor de glicose controlando a secreção de insulina pelas células beta. A atividade da GK automaticamente aumenta ou diminui com as concentrações de glicose nas células beta. A insulina ativa a AKT, está por sua vez fosforila a FOXO1, transloca-se do núcleo para o citoplasma, tornando-se inativa e permitindo a transcrição de PDX1 (seta pontilhada cinza). Quando a fosforilação da AKT não ocorre ou reduz, ela transloca-se do citoplasma para o núcleo, tornando-se ativa e silenciando o PDX1 (seta pontilhada vermelha). Abreviações: GLUT2 (transportador de glicose 2), GK (glicoquinase), G6P (glicose-6-fosfato), AKT (proteína quinase B), PI3K (fosfatidilinositol-3-quinase), PDX1 (fator *homeobox* pancreático-duodenal) e FOXO1 (fator de transcrição *forkhead box O1*)

Fonte: A autora, 2017.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar os efeitos do uso de bloqueadores dos receptores da angiotensina (BRA), Losartana (um BRA puro) e/ou Telmisartana (um BRA e agonista parcial PPAR gama) no remodelamento dos adipócitos brancos subcutâneos, na morfofisiologia e preservação das ilhotas pancreáticas em camundongos com obesidade induzida por dieta.

2.2 Objetivos específicos

- a) Induzir a obesidade e suas comorbidades através da administração de dieta hiperlipídica (HF) em camundongos da linhagem C57BL/6;
- b) Acompanhar a evolução da massa corporal, pressão arterial sistólica, calorimetria indireta e ingestão alimentar dos animais durante o período experimental;
- c) Avaliar a resistência à insulina através da glicose e insulina plasmática de jejum;
- d) Analisar no TABs do grupo tratado com losartana, a formação de adipócitos bege com foco na expressão de genes termogênicos (β 3-AR, BMP-8b e UCP1) e remodelamento dos adipócitos (CD137, PRDM16 e FNDC5/Irisina);
- e) Analisar no pâncreas os efeitos do tratamento em relação ao remodelamento e preservação das ilhotas pancreáticas com foco na detecção e utilização da glicose, vascularização e apoptose do pâncreas endócrino.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais, dieta e tratamento

Todos os procedimentos experimentais realizados seguiram as normas estabelecidas no guia convencional para a experimentação com animais (Publicação NIH N°. 85-23, revisado em 1996). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ (protocolo número CEUA/013/2015, Anexo 1).

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 com 4 semanas de idade, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, alocados no biotério do Laboratório de morfometria, metabolismo e doença cardiovascular - LMMC. Os camundongos foram mantidos sob condições controladas (temperatura $20 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade de $60 \pm 10\%$ e ciclo de luz de 12h de escuridão / 12h de claro) em gaiolas isentas de organismos patogênicos, com livre acesso à comida e água.

Com 12 semanas de idade, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos nutricionais e alimentados durante 10 semanas da seguinte forma:

- a) Dieta controle (*Standard Chow* - C, n = 40), energia total de 3800 kcal/g (76% em energia de carboidratos, 14% em energia de proteínas e 10% em energia de lipídios);
- b) Dieta rica em gordura (*High Fat* - HF, n = 40), energia total de 5000 kcal/g (36% em energia de carboidratos, 14% em energia de proteínas e 50% em energia de lipídios).

As dietas experimentais seguiram as recomendações do Instituto Americano de Nutrição (AIN-93 M), própria para roedores (Reeves, Nielsen et al. 1993), e foram elaboradas com nutrientes purificados pela empresa PragSoluções (Jaú, São Paulo, Brasil, www.prag solucoes.com.br), a composição encontra-se detalhada na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição das dietas experimentais, de acordo com recomendações da AIN-93M

Ingredientes (g/kg)	Dieta	
	C	HF
Caseína (>85% proteína)	140	175
Amido de milho	466	193
Amido dextrinizado	155	155
Sacarose	100	100
Óleo de soja	40	40
Banha de porco	-	238
Fibra	50	50
Mix Vitaminas	10	10
Mix Minerais	35	35
Cisteína	1,8	1,8
Colina	2,5	2,5
Antioxidante	0,008	0,008
Energia (kcal/kg)	3800	5000
Carboidrato (%)	76	36
Proteína (%)	14	14
Lipídios (%)	10	50

Após o período de indução de obesidade (10 semanas), os camundongos de cada grupo foram subdivididos aleatoriamente em quatro grupos (n = 10 por grupo), uma vez que a probabilidade necessária para o $P < 0,05$ é de $P = (1/2)^n < 0,05$, sendo este $n = 5$ (Cruz-Orive and Weibel 1990), perfazendo oito grupos que seguem:

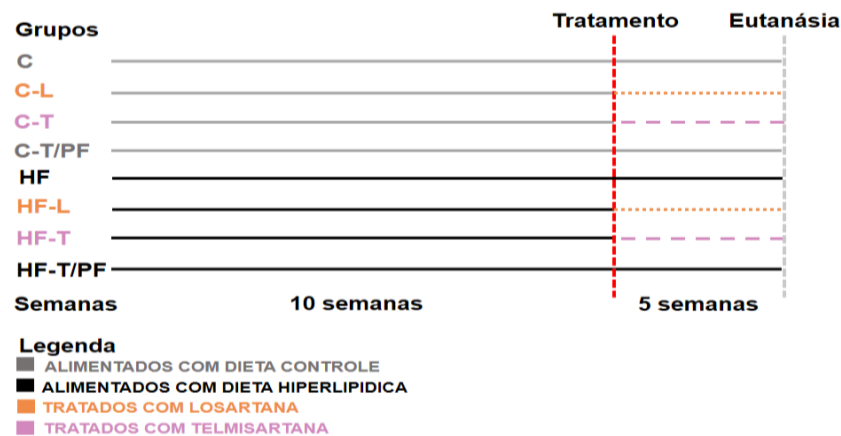
- a) **C**: camundongos alimentados com dieta controle.
- b) **C-L**: camundongos C tratados com losartana potássica (10 mg/kg/dia), Cozaar®, Merck.
- c) **C-T**: camundongos C tratados com telmisartana (10 mg/kg/dia), Micardis®; Boehringer Ingelheim.
- d) **C-T/PF**: camundongos *pair-feeding* do grupo C-T; não tratado, camundongos alimentados com dieta controle na mesma quantidade ingerida pelo grupo C-T.
- e) **HF**: camundongos alimentados com dieta rica em gordura.
- f) **HF-L**: camundongos HF tratados com losartana potássica (10 mg/kg/dia), Cozaar®, Merck.
- g) **HF-T**: camundongos HF tratados com telmisartana (10 mg/kg/dia), Micardis®; Boehringer, Ingelheim;
- h) **HF-T/PF**: camundongos *pair-feeding* do grupo HF-T; não tratado, camundongos alimentados com dieta rica em gordura na mesma quantidade ingerida pelo grupo HF-T.

Baseado em estudo prévio com tratamento com telmisartana, os grupos C-T e HF-T exibiram ingestão alimentar menor que os grupos C e HF (Penna-de-Carvalho, Graus-Nunes

et al. 2014). A fim de isolar os efeitos advindos da menor ingestão energética daqueles oriundos do tratamento com fármaco foi incluído os grupos *pair-feeding*. A ingestão alimentar diária (gramas/animal) dos grupos *pair-feeding* (C-T/PF e HF-T/PF) correspondeu à quantidade de dieta (em gramas) consumida pelos grupos tratados no dia anterior. Desta forma, os animais do grupo *pair-feeding* tinham sua ingestão alimentar em gramas diárias determinada pelo(s) grupo(s) tratado(s) (C-T ou HF-T) com quem eram pareados. Vale ressaltar que a dieta dos grupos *pair-feeding* não tinham a adição do fármaco. Não houve necessidade de incluir o grupo *pair-feeding* para os animais tratados com losartana, uma vez que previamente já havia sido relatado que a ingestão alimentar se assemelhava aos seus grupos controles (Frantz, Crespo-Mascarenhas et al. 2013).

Os tratamentos tiveram duração de cinco semanas e os fármacos foram adicionados à dieta nas quantidades descritas anteriormente. A figura 11 representa um esquema simplificado do experimento realizado.

Figura 11 – Desenho experimental. Linha do tempo, demonstrando o período de administração da dieta com e sem tratamento



Legenda: Aos três meses de idade os camundongos machos foram divididos em dois grandes grupos, um grupo que recebeu dieta controle (C) e outro que recebeu dieta hiperlipídica (HF). Após dez semanas de administração da dieta, esses grupos foram redivididos perfazendo oito grupos, o grupo C, o grupo C-L (tratado com losartana), o grupo C-T (tratado com telmisartana), o grupo C-T/PF (não tratado), o grupo HF, grupo HF-L (tratado com losartana), o grupo HF-T (tratado com telmisartana) e grupo HF-T/PF (não tratado). Após as 10 semanas o tratamento foi iniciado com losartana e telmisartana duraram cinco semanas, totalizando 15 semanas de experimento.

Fonte: A autora, 2017.

3.2 Ingestão alimentar, massa corporal (MC) e pressão arterial (PA)

A ingestão alimentar (em gramas) foi avaliada diariamente, sempre no mesmo horário, entre 10 e 12 horas. O resto/ingestão dos animais foi avaliado mediante subtração entre a quantidade total de ração ofertada e a quantidade remanescente na caixa, sendo esse remanescente descartado devido ao alto conteúdo de gordura da dieta HF, suscetível à rancificação. A ingestão energética foi calculada pela ingestão de ração (gramas/dia), multiplicada pela energia da ração em quilocalorias (kcal), o valor obtido em quilocalorias foi convertido para quilojoules (kJ), medida universal de energia.

No grupo *pair feeding*, a quantidade de alimentos (em gramas) fornecida aos grupos C-T/PF e HF-T/PF foi calculada para conter a mesma quantidade em energia que aquelas ingeridas pelos grupos C-T e HF-T no dia anterior.

A massa corporal (MC) foi aferida em balança digital (precisão 0,01 g) e a pressão arterial sistólica (PAS) através do método não invasivo de plestimografia da artéria caudal (Letica LE 5100; Panlab, Barcelona, Espanha), ambos avaliados semanalmente. Para PAS, os animais foram adaptados durante quatro semanas para minimizar o estresse e a média de três aferições em cada momento foi utilizada.

3.3 Calorimetria indireta

Ao final do tratamento, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas ligadas em um sistema de módulos de calorimetria (Panlab Havard Apparatus, Barcelona- Espanha) durante três dias com livre acesso à dieta e à água. Este sistema monitora o consumo de oxigênio (VO_2), a produção de gás carbônico (VCO_2), a taxa de troca respiratória e a temperatura dos animais. Os dados foram coletados a cada 3 minutos durante 72 horas. O consumo de oxigênio é calculado por grama de massa corporal metabólico (MC)^{0,75}. Os dados das primeiras 24 horas foram descartados, pois foram considerados dados de aclimação. O gasto energético (EE) diário e o quociente respiratório (RQ) foram calculados a partir dos dados coletados.

3.4 Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)

O teste oral de tolerância à glicose (TOTG) foi realizado ao final do experimento, após os animais passarem por um período de seis horas de jejum. Amostras de sangue para determinação da concentração de glicose plasmática foram obtidas da veia caudal após uma pequena incisão na ponta da cauda. Em seguida, a glicose (1,0 g/kg) foi administrada por gavagem orogástrica. A concentração de glicose plasmática foi aferida antes da sobrecarga de glicose e nos tempos subsequentes: 15, 30, 60 e 120 minutos, utilizando-se um glicosímetro (Accu-chek, Roche Diagnósticos, Alemanha). A área sob a curva (AUC) foi calculada para o TOTG de 0 a 120 minutos, utilizando a regra trapezoidal (GraphPad Prism versão 7.01 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) para avaliar a intolerância à glicose.

3.5 Sacrifício e extração dos tecidos

Depois de 15 semanas de dieta (incluindo as cinco semanas de tratamento), os animais foram submetidos a um período de jejum de seis horas, heparinizados e administrado pentobarbital sódico (150 mg/kg) por via intraperitoneal. O abdômen e tórax foram abertos, o sangue coletado por punção cardíaca do átrio direito e separado por centrifugação (120 g por 20 minutos) em temperatura ambiente, em seguida, o plasma foi coletado e armazenado a -20 °C para análises futuras. Os órgãos alvos do estudo, tecido adiposo subcutâneo e pâncreas, foram cuidadosamente dissecados e serão descritos adiante em sessões separadas.

3.6 Análise plasmática

A concentração plasmática de insulina e GLP1 foram analisadas utilizando os kits de ensaios de imunoabsorção ligados a enzima da empresa Millipore (Kit de ELISA *Rat/Mouse Insulin* Cat. #EZRMI-13K e kit de ELISA GLP1 de várias espécies Cat. # EZGLP1T-36K, Millipore , Missouri, EUA), foi utilizado o equipamento TP-READER *Thermoplate* (Bio Tek Instruments, Inc Highland Park, EUA).

Os níveis de glicose plasmática em jejum foram determinados usando um espectrofotômetro automático e um kit comercial de glicose monoreagente – K082 (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil).

Para o tecido adiposo, foi utilizado o índice quantitativo de verificação de sensibilidade à insulina (QUICKI), usando a fórmula: $(QUICKI = 1 / [\log (\text{insulina em jejum}) + \log (\text{glicemia de jejum})])$ (Katz, Nambi et al. 2000).

Para o pâncreas, foi realizado a avaliação do modelo de homeostase da resistência à insulina (HOMA-RI), calculado pela seguinte fórmula: $HOMA-IR = [\text{glicose plasmática de jejum (mmol/L)} \times \text{insulina plasmática de jejum } (\mu\text{UI/L})/22,5]$ e HOMA da função de células beta (HOMA-BETA), um marcador de secreção basal de insulina pelas células beta pancreáticas, foi calculado como $HOMA-BETA = [20 \times \text{nível de insulina em jejum } (\mu\text{IU/L})/\text{glicose plasmática de jejum (mmol/L)} - 3,5]$ (Matthews, Hosker et al. 1985).

3.7 Tecido adiposo

O tecido adiposo epididimal (genital), retroperitoneal e inguinal foram cuidadosamente dissecados e tiveram sua massa aferida em balança de precisão 0,01 g (BL-3200H). Uma parte do material (referente à amostra de cinco animais) foi armazenada em freezer com temperatura -80°C visando à técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (RT-qPCR), enquanto o material dos demais animais (n=5) seguiram o protocolo para posterior processamento para microscopia de luz, sendo fixados em solução fixadora recentemente preparada [4% (w/v) de formaldeído e tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 durante 48 horas à temperatura ambiente]. Após a fixação (48 horas), o material foi processado, sendo desidratado em álcoois de concentrações crescentes até alcançarem o álcool absoluto, diafanizados em xilol e incluídos em Paraplast Plus® (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América) para serem seccionados para futuras análises.

A gordura retroperitoneal (conectada à parede abdominal posterior perto dos rins e a porção abdominal dos ureteres) e a gordura epididimal (localizada na parte inferior do abdômen e ligado ao epidídimo) foram consideradas gordura intra-abdominal. A gordura inguinal, localizada entre a parte inferior da caixa torácica e o meio do membro inferior, foi considerada gordura subcutânea. O TABs é a porção do TAB onde foi localizado o primeiro

foco de *browning* com capacidade termogênica (Young, Arch et al. 1984, Wu, Bikopoulos et al. 2014).

O índice de adiposidade foi determinado como a razão entre a soma das massas das gorduras intra-abdominal e subcutânea, dividido pelo total da MC e apresentado como porcentagem.

3.8 Morfometria de adipócitos

Os blocos do TABs foram cortados em 5 micrometros (μm) de espessura e as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE). Para quantificação, foram adquiridas imagens digitais de dez campos aleatório, não consecutivos e foram avaliados cerca de 50 adipócitos por animal (formato TIFF, 36-bit color, 1280x1024 pixels) com auxílio de câmera (Infinity 1-5, Lumenera Co., Ottawa, ON, Canadá) e microscópio de luz (DMRBE, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha). As imagens foram analisadas pelo software Image-Pro Plus versão 7.01 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Os resultados foram utilizados para determinar a distribuição de tamanho dos adipócitos nos diferentes grupos.

3.9 Estereologia do tecido adiposo

A área seccional média dos adipócitos foi mensurada por estereologia pela razão entre a densidade de volume dos adipócitos (V_v) e duas vezes a densidade numérica de adipócitos por área, como descrito previamente (Bargut, Souza-Mello et al. 2016). Brevemente, o V_v foi calculado pela razão entre os pontos parciais (que tocam no adipócito) e pontos totais (total de pontos da área teste produzida pelo *STEPanizer* (www.stepanizer.com)). A densidade numérica de adipócitos por área foi mensurada considerando o número de adipócitos em uma área determinada também produzida pelo *STEPanizer*, os adipócitos foram contados na área quando não tocavam na “linha proibida” ou suas extensões (Barbosa-da-Silva, Fraulob-Aquino et al. 2012).

3.10 Imunofluorescência do tecido adiposo

Para a imunofluorescência, os cortes de TABs (5 μm) foram desparafinizados e hidratados. A recuperação antigênica com tampão citrato (pH 6,0, a 60° C por 20 min) foi realizada e, em seguida, foi feito o bloqueio com glicina a 2% e tampão de bloqueio (PBS/5%BSA). Os cortes foram incubados *overnight* à 4°C com o anticorpo anti-UCP1 (sc-6529, Santa Cruz) ou anti-AT1r (AB15552), ambos na diluição 1:50 em PBS/ BSA 1%. Subsequentemente as lâminas foram incubadas por uma hora, em temperatura ambiente, com anticorpos secundários conjugados com fluorocromo Alexa-488 (anti-coelho – UCP1 e anti-cabra –AT1r), na diluição 1:50 em PBS/ BSA 1%. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS e montadas com 4,6-diamidíno-2fenilindola, dihidroclorido (DAPI) para visualização dos núcleos celulares e *slow-fade* (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA) a fim de manter a fluorescência. Imagens digitais imunofluorescentes foram obtidas utilizando o microscópio confocal (Sistema de Microscopia Confocal a Laser Digital, Nikon, modelo C2, EUA).

3.11 PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

A extração do ácido ribonucleico (RNA) total do TABs foi realizado utilizando 700 μL de Trizol (Invitrogen, CA, USA). Posteriormente, adicionaram-se 100 μL de clorofórmio, seguido de centrifugação (11.200 rpm, por dez minutos a 4°C), retirou-se o sobrenadante da fase aquosa, o qual corresponde ao RNA. A esse, adicionaram-se 250 μL de isopropanol para precipitação do RNA, com posterior centrifugação (11.200 rpm, por 10 minutos a 4 °C) e formação de um pellet de RNA. Em seguida, retirou-se totalmente o isopropanol, ressuspendendo com 500 μL de etanol 70%, seguido de centrifugação (11.200 rpm, por 5 minutos a 4°C). O etanol foi totalmente retirado e o pellet ressuspendido em 40 μL de água deionizada (MilliQ). A concentração de RNA foi determinada através de espectroscopia utilizando o equipamento Nanovue (GE Life Sciences), 1 μg de RNA foi alíquotado e acrescentou-se desoxirribonuclease (DNase) I (Invitrogen). O cDNA foi sintetizado utilizando primers Oligo (dT) para RNAm e Superscript III transcriptase-reversa (Invitrogen, CA, USA). O PCR em tempo real foi realizado utilizando o termociclador Biorad CFX96 e

mix *SYBR Green* (Invitrogen, CA, USA). Os primers foram produzidos utilizando o software online Primer3, e estão descritos na tabela 3. O controle endógeno beta-actina, foi utilizado para corrigir a expressão dos genes-alvo. A eficiência da corrida dos genes-alvo e dos genes endógenos foram aproximadamente iguais, sendo calculada através de diluições em série do cDNA. As reações de amplificação seguiram as seguintes condições: desnaturação e ativação da polimerase (4min a 95°C), foram realizados 44 ciclos, cada ciclo consistindo em 95°C durante 10 segundos e 60°C durante 15 segundos, seguidos por uma curva de *melting* (60°C a 95°C, com taxa de aquecimento de 0,1°C/s). Os controles negativos consistiram de poços em que cDNA foi substituído por água deionizada. A razão de expressão relativa (QR) de RNAm foi calculada pela equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde o ΔCt expressa a diferença entre o número de ciclos (TC) dos genes-alvo e da média dos controles endógenos (Bustin, Benes et al. 2009).

Tabela 3 - Detalhamento dos *primers* utilizados

Gene	Primers	
	5'-3'	3'-5'
Adiponectina	GTTGCAAGCTCTCCTGTTCC	ATCCAACCTGCACAAGTTCC
β 3-AR	ACAGGAATGCCACTCCAATC	TTAGCCACAACGAACACTCG
NF-KB	GAATCCTCAGCATCCTGCTC	GCAGGCTATTGCTCATCACA
IL-6	AGTTGCCTTCTTGGGAGTGA	ACAGGTCTGTTGGGAGTGGT
TNF-alfa	TCAGCCGATTTGCTATCTCA	TGGAAGACTCCTCCCAGGTA
PPAR-alfa	TCGGACTCGGTCTTCTTGAT	TCTTCCCAAAGCTCCTTCAA
PPAR-beta	TGGAGCTCGATGACAGTGAC	GGTTGACCTGCAGATGGAAT
PPAR-gama	ACGATCTGCCTGAGGTCTGT	CATCGAGGACATCCAAGACA
PGC1- α	GTCAACAGCAAAAGCCACAA	GTGTGAGGAGGGTCATCGTT
NFR1	GTTGGTACAGGGGCAACAGT	GTAACGTGGCCCAGTTTTGT
TFAM	GAAGAACGCATGGAGGAGAG	TTCTGGGGAGAGTTGCAGTT
BMP-8b	CTATGCAGGCCCTGGTACAT	AGGCCTGGACTACCATGTTG
PRDM16	AGGGCAAGAACCATTACACG	GGAGGGTTTTGTCTTGTCCA

FNDC5/Irisina	GGTGCTGATCATTGTTGTGG	CGCTCTTGGTTTTCTCCTTG
UCP1	TCTCAGCCGGCTTAATGACT	TGCATTCTGACCTTCACGAC
CD137	CCCACATATTCAAGCAACCA	GCTCATAGCCTCCTCCTCCT
Beta – Actina	TGTTACCAACTGGGACGACA	GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA

Abrev.: Receptor Beta 3 adrenérgico (β 3-AR), Fator nuclear kappa b (NF-KB), Interleucina 6 (IL-6), Fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa), Receptor ativador de proliferação peroxissomal (PPAR), coativador-1 alfa de proliferação peroxissomal gama (PGC1- α), Fator respiratório nuclear 1 (NFR1), Fator de transcrição mitocondrial A (TFAM), proteínas morfogenéticas ósseas-8b (BMP-8b), Domínio PR contendo 16 (PRDM16), Fibronectina tipo III contendo proteína 5 (FNDC5)/irisina, Termogenina (UCP1) e CD137 (*cluster* de diferenciação 137).

3.12 Pâncreas

Os pâncreas de alguns animais (n=5) foram totalmente dissecados, pesados e seguiram o protocolo de rotina de processamento para o pâncreas; enquanto que em outros animais (n=5) foi realizado o protocolo de isolamento das ilhotas pancreáticas.

3.13 Microscopia de luz

Os pâncreas destinados para histologia foram dissecados (n=5), pesados, para determinar sua massa (Fernandes-Santos, Carneiro et al. 2009) e fixados em solução fixadora recentemente preparada. Após a fixação, os pâncreas foram processados para técnicas histológicas e incluídos em Paraplast Plus® (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América) a fim de serem seccionados para futuras análises de microscopia de luz e confocal, conforme descrito previamente no TABs. A tíbia direita foi dissecada para expor as duas extremidades e o comprimento da tíbia foi medido com o auxílio de um paquímetro para corrigir a massa do pâncreas (Yin, Spurgeon et al. 1982).

3.14 Estereologia do pâncreas

O pâncreas foi cortado de forma seriada com 5 μm de espessura, começando em um corte aleatório com intervalo maior que 100 μm para o corte seguinte, evitando, desta forma, a avaliação da mesma ilhota. Então, os cortes foram corados com HE e visualizados por microscopia de luz para obtenção de imagens digitais do tecido pancreático (formato TIFF, 36-bit, 1280 \times 1024 pixels). As imagens digitais foram obtidas com o microscópio Leica DMRBE (Wetzlar, Alemanha) e câmera Lumenera digital Infinito (Ottawa, ON, Canadá). Um total de 150 ilhotas por grupo foram estudadas, de forma aleatória, nos cortes não consecutivos usando uma grade composta por 36 pontos totais (PT) (Mandarim-de-Lacerda, Fernandes-Santos et al. 2010). Resumidamente, a densidade de volume das ilhotas pancreáticas (V_v) foi analisada com o auxílio do software STEPanizer através da razão entre os pontos parciais (PP) que tocavam a ilhota em relação aos pontos totais (PT): $V_v [\text{ilhota}] = \text{PP}[\text{ilhota}]/\text{PT} (\%)$.

A massa de ilhotas ($M [\text{ilhota}]$) foi obtido através do produto do $V_v [\text{ilhota}]$ pela massa pancreática (medido anteriormente). A área seccional média da ilhota ($A [\text{ilhota}]$) foi estimada como a relação entre $V_v [\text{ilhota}]$ e densidade numérica por área das ilhotas ($QA [\text{ilhota}]$), ou seja, $A [\text{ilhota}] = V_v [\text{ilhota}] / 2.QA [\text{ilhota}]$ (Mandarim-de-Lacerda 2003).

A densidade de volume das células alfa ($V_v [\text{célula-alfa}]$) e de células beta ($V_v [\text{célula-beta}]$) foram calculadas utilizando uma ferramenta do software Image-Pro Plus (versão 7.0, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) usada para identificar áreas de imunorreatividade positiva (áreas glucagon-positiva e áreas de insulina-positiva, respectivamente, após imuno-histoquímica). Primeiramente, a ilhota foi selecionada manualmente e segmentada em preto e branco, nos quais as áreas imunorreativas eram marcadas em branco e o tecido remanescente, em preto. A área ocupada pela marcação em branco foi então quantificada com o auxílio de um histograma (Souza-Mello, Gregorio et al. 2011). O $V_v [\text{células alfa}]$ e $V_v [\text{células beta}]$ foram expressos como uma percentagem da ilhota.

A massa de células alfa ($M [\text{células alfa}]$) e a massa de células beta ($M [\text{células beta}]$) foram em seguida estimadas como o produto de $V_v [\text{de células alfa}]$ ou $V_v [\text{das células beta}]$, respectivamente, pela massa da ilhota pancreática ($M [\text{ilhota}]$) (Souza-Mello, Gregorio et al. 2011).

3.15 Imunohistoquímica e imunofluorescência das ilhotas

Para a técnica de imunohistoquímica, após a desparafinização, a recuperação antigênica do pâncreas foi realizada com tampão citrato (60°C, pH 6.0, por 20 minutos) a fim de facilitar a localização de proteínas intracelulares. Após isso, a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com 0,3% de peróxido de hidrogênio em PBS. A seguir, os cortes foram incubados com anticorpos primários: anti-insulina (insulina [H-86], sc-9168, Santa Cruz), anti-glucagon (AB 36232, ABCAM), anti - caspase-3 (NB500- 210, Novus Biologicals), anti- alfa actina de músculo liso (alfa-SMA;ab7817, ABCAM) e anti-*cluster* de diferenciação 31 (CD31;ab28364, ABCAM), todos eles diluído em 1:100. As reações foram amplificadas pelo amplificador (954D-31), seguido por incubação com detector de polímero HRP (954D-32) (*HiDef Detecção HRP Polímero Sistema*, Marque Celular, CA, EUA). Os cortes foram lavados em PBS, revelados com 3'3'diaminobenzidine líquida (*DAB Substrate Kit*, Marque Celular, CA, EUA), e contrastadas com hematoxilina. As imagens digitais foram obtidas no microscópio Leica DMRBE (Wetzlar, Alemanha) com a câmera digital Lumenera Infinito (Ottawa, ON, Canadá).

Para imunofluorescência, após a desparafinização, a recuperação antigênica foi realizada utilizando um tampão de citrato (60°C, pH 6.0, durante 20 minutos), foi feito bloqueio com glicina a 2% e tampão de bloqueio (PBS/BSA a 5%). Os cortes foram simultaneamente incubados com anticorpo anti-insulina (ab7842, ABCAM) e anti-glucagon (ab36232, ABCAM). Os anticorpos primários foram diluídos a 1:50 em tampão de bloqueio (PBS/BSA a 1%) e incubados durante a noite a 4°C. Posteriormente, as amostras foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente com anticorpos secundários conjugados com fluorocromo: Alexa-488 (ovelha) para glucagon e Alexa-546 (porquinho da índia) para insulina (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA), ambos diluídos a 1:50 em PBS / BSA a 1%.

Além disso, outros cortes foram incubados com o anticorpo primário: anti- proteína restrita a macrófagos (F4/80; MCA497GA, Bio-Rad), anti-PDX1 (ab47383, ABCAM), anti-GLP1 (sc-80602, Santa Cruz), anti-fator de crescimento endotelial vascular (VEGF;sc-7269, Santa Cruz) e anti-alfa-SMA (ab7817, ABCAM), todos diluídos 1: 100 em PBS / BSA a 1% durante 2 horas à temperatura ambiente e incubados durante a noite a 4°C. Subsequentemente, os seguintes anticorpos secundários conjugados com fluorescência foram adicionados aos cortes: Alexa-546 (camundongo) para anti-F4/80, Alexa- 488 (camundongo) para anti-GLP1,

anti-VEGF e anti-alfa-SMA e Alexa 488 (cabra) para anti-PDX1 (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA).

Os cortes foram então incubados à temperatura ambiente durante 1 hora. Após lavagem em PBS, todas as lâminas foram montadas com DAPI para visualização dos núcleos celulares e *slow-fade* (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA) a fim de manter a fluorescência.

Para avaliação da apoptose, o Kit de detecção de apoptose *In Situ ApopTag® plus fluorescein* (S7111, Millipore - EUA) foi utilizado para a detecção de células positivas. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

As imagens da imunofluorescência foram capturadas usando a microscopia confocal (Sistema de Microscopia Confocal a Laser Digital, Nikon, modelo C2, EUA), formato TIFF, cor de 24 bits, 512 x 512 pixels.

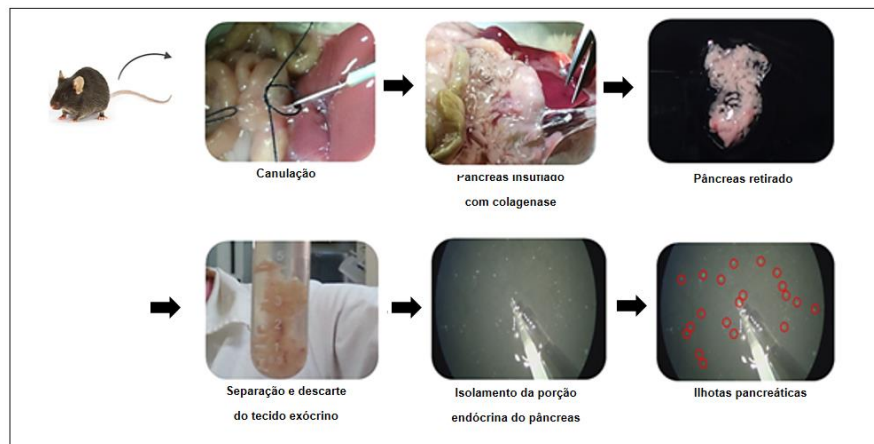
3.16 Isolamento das ilhotas

Em outro grupo de animais, as ilhotas foram isoladas por digestão com colagenase (n = 5) (Lacy and Kostianovsky 1967), que consiste na destruição seletiva do parênquima exócrino pancreático. Para tanto, após incisão abdominal, o fígado foi rebatido para expor a vesícula biliar. O ducto biliar foi localizado e suas porções cranial (fígado e vesícula biliar) e caudal (duodeno) foram amarradas para evitar a saída de solução de colagenase. Introduziu-se uma cânula no interior do ducto biliar para que o pâncreas pudesse ser inflado através do ducto pancreático com solução de Hanks (suplementado com albumina sérica bovina – BSA 1,0 mg/mL) contendo 0,8 mg/mL de colagenase tipo V (C9263, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Foi injetado um volume inicial de três mL, completando-se para um volume final de cinco mL.

Posteriormente, o pâncreas foi removido, colocado em um tubo Falcon de 15 mL e submerso em banho-maria a 37 °C durante 15 minutos, para permitir a digestão do tecido exócrino pela colagenase. Em seguida, o tubo foi agitado vigorosamente durante 15 segundos para facilitar a desagregação do tecido pancreático e, imediatamente, foi adicionado 10 mL de solução de Hanks resfriada (4 °C), com objetivo de interromper a digestão pela colagenase. O digerido foi lavado três vezes com solução de Hanks resfriada e centrifugado a fim de desprezar o tecido exócrino. As ilhotas foram coletadas manualmente em placa de Petri com

fundo preto, com auxílio de um microscópio estereoscópico com câmera (Luxeo 4D, LABOMED, CA, EUA) através da pipeta de Pasteur e imediatamente congeladas em freezer - 80°C (figura 12) e destinadas à técnica de *Western blot*.

Figura 12 – Isolamento das ilhotas pancreáticas pelo método da colagenase



Legenda: Foi introduzida uma cânula no interior do ducto colédoco para que o pâncreas pudesse ser inflado com solução de Hanks suplementada com BSA. O pâncreas então foi removido, colocado em tubo Falcon e incubado para permitir a digestão do tecido exócrino, seguida por sucessivas lavagens para a eliminação do tecido digerido. As ilhotas pancreáticas, preservadas pela digestão com colagenase, foram então isoladas e recolhidas.

Fonte: Adaptada de (Borges 2015).

3.17 *Western blotting* das ilhotas isoladas

As ilhotas foram centrifugadas (11.000 rpm a 4 °C durante 10 minutos), o sobrenadante foi recolhido e a concentração de proteína foi determinada utilizando um kit de ensaio de proteínas BCA (*Thermo Scientific*, Rockford, IL, EUA). A mesma concentração de proteínas (~20 µg) por amostra foram desnaturadas (5 minutos a 100 °C), separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (8-10%, SDS-PAGE) e transferidas para uma membrana de PVDF (*polyvinylidifluoride*, *Amersham Biosciences*, *Piscataway*, NJ, EUA). Sequencialmente, a membrana foi incubada com anticorpo primário (3% BSA) e anticorpo secundário (5% leite em pó desnatado Molico®), ambos diluídos em tampão salina com Tris (TBS-T [20 mmol/L de Tris/HCl (pH 7,4) e 500 mmol/L de NaCl] em temperatura ambiente, durante duas horas para evitar ligações inespecíficas.

As membranas foram incubadas *overnight* à 4°C com os seguintes anticorpos primários:

- a) AKT total(Akt / PKB,anti-coelho, 44-609G, Invitrogen; 1: 500 / 60 kDa);
- b) pAKT (Akt / PKB [pS473],anti-coelho, 44-621G, Invitrogen; 1: 500 / 65 kDa);
- c) GLUT2 (anti-coelho, 07-1402, MERK MILLIPORE; 1: 500 / 57 kDa);
- d) FOXO1 (anti-coelho, SAB4300410; SIGMA; 1:500 / 78-82 kDa);
- e) p-FOXO1 (anti-coelho, , SAB4300112; SIGMA; 1:500 / 78-82 kDa);
- f) PDX1 (anti-cabra, sc-14664; Santa Cruz, Biotecnologia; 1: 500 / 46 kDa);
- g) GK (anti-coelho, AB37796, ABCAM; 1:500 / 65 kDa);
- h) AT1r (anti-coelho, ab15552, Merck Millipore; 1:500 / 41 kDa).

Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário específico para a origem do anticorpo primário, durante uma hora à temperatura ambiente. A expressão das proteínas foi detectada por meio de um sistema de detecção de quimiluminescência com ECL e as imagens das bandas foram obtidas com o Sistema ChemiDoc XRS de imagens moleculares (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). A intensidade das bandas quimioluminescentes foi quantificada utilizando o software ImageJ, versão 1.44 (NIH,imagej.nih.gov/ij, EUA).

Após esta etapa, os anticorpos foram retirados das membranas por solução *stripping* e remarcados com beta-actina (anti-camundongo, sc-81178, Santa Cruz Biotecnologia, 1:1000), como proteína constitutiva para normalizar os dados obtidos, exceto para pAKT e p-FOXO1 que foram corrigidas pela AKT total e FOXO1 total, respectivamente.

3.18 Análise estatística

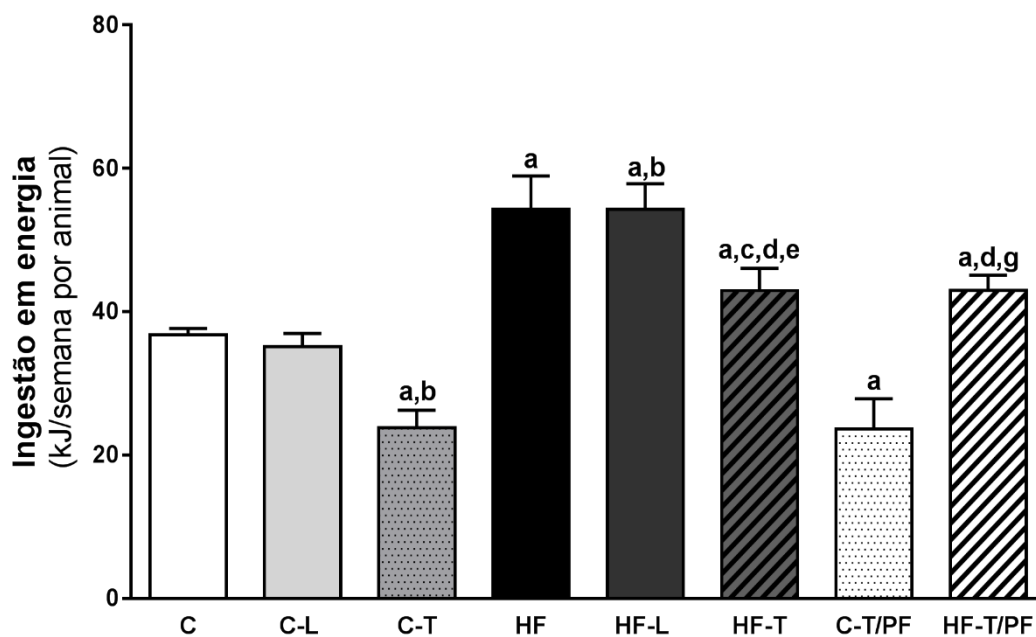
Todos os dados foram testados quanto à normalidade e homocedasticidade das variâncias, os valores são apresentados como média e desvio padrão (DP). As diferenças entre os grupos foram testadas pela análise de variância (ANOVA) de um fator (*one-way*), seguida pelo pós-teste de *Holm-Sidak*. As possíveis interações entre as variáveis dieta e tratamentos foram testadas utilizando ANOVA de dois fatores (*two-way*). Em todos os casos, o nível de significância adotado foi o valor de $P < 0,05$, realizado pelo programa GraphPad Prisma (versão 7,01 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA EUA), o qual foi utilizado para confecção dos gráficos.

4 RESULTADOS

4.1 Ingestão energética e massa corporal

O grupo HF apresentou maior ingestão energética que o grupo C (+48%, $P < 0,0001$). O grupo HF-L não mostrou-se diferente do grupo HF quanto a sua ingestão energética. No entanto, o grupo HF-T teve um consumo energético reduzido quando comparado ao grupo HF (-21%, $P = 0,0002$) e HF-L (-21% $P = 0,0002$). O grupo HF-T / PF, não tratado, apresentou menor ingestão em energia do que o grupo HF (-21%, $P = 0,0240$), porém, nenhuma diferença quando comparado com HF-T. Os resultados são demonstrados na figura 13.

Figura 13 – Ingestão alimentar em energia (kJ), referente ao período de tratamento (5 semanas)



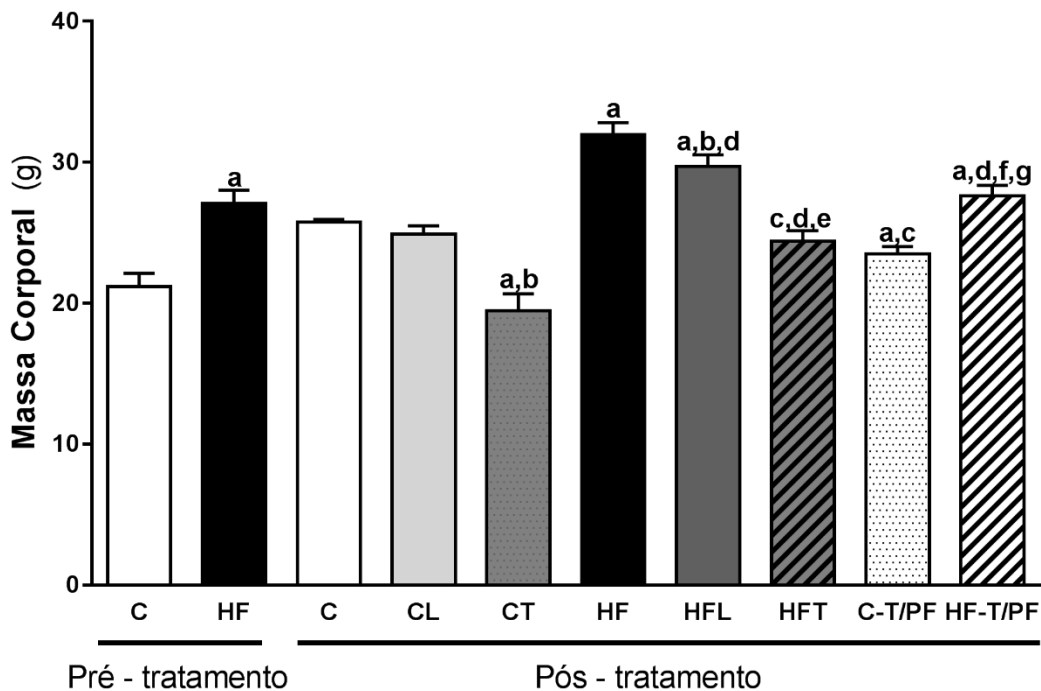
Legenda: Os dados são apresentados como média \pm DP, (n=5). Grupos: dieta controle (C), C tratado com losartana (C-L), C tratado com telmisartana (C-T), dieta rica em gordura (HF), HF tratado com losartana (HF-L), HF tratado com telmisartana (HF-T); C não-tratado telmisartana, *pair-fed* (C-T / PF) e HF não-tratado telmisartana, *pair-fed* (HF-T / PF). $P < 0,05$ quando comparado com o grupo C [a], grupo C-L [b], grupo C-T [c], grupo HF [d], grupo HF-L [e], grupo HF-T [f] e C-T / PF [g].

A dieta exerceu um efeito significativo na ingestão de energia ($P < 0,0001$, ANOVA de dois fatores), mas apenas o tratamento com telmisartana influenciou significativamente este parâmetro (representou 28,81% da Variância total, ANOVA dois fatores, $P < 0,0001$). Não houve interação entre as variáveis.

Após 10 semanas de dieta para induzir a obesidade, foi observado um aumento da massa corporal (MC) no grupo HF quando comparado ao grupo C (+29%, $P < 0,0001$), conforme pode ser observado na figura 14, no período pré-tratamento. É importante ressaltar que os grupos tratados iniciaram o tratamento sem diferença significativa quando comparado com as suas respectivas contrapartes.

Após cinco semanas de tratamento, o grupo HF-L apresentou redução da MC, -6% ($P=0,0002$) quando comparado ao grupo HF. O grupo HF-T teve uma redução expressiva da MC quando comparado ao grupo HF (-22%, $P < 0,0001$) e HF-L (-17%, $P < 0,0001$). Além disso, o grupo HF-T apresentou uma MC semelhante ao grupo C. Por outro lado, os grupos *pair-feeding* (C-T / PF e HF-T / PF) apresentaram um incremento da MC quando comparados as suas contrapartes: o grupo C-T / PF mostrou um aumento de +26% quando comparado ao C-T ($P=0,0006$) e o grupo HF-T / PF teve um aumento de +12% quando comparado com HF-T ($P < 0,0001$). Essas observações garantem que a MC reduzida alcançada após o tratamento com telmisartana, não podem ser atribuídas a ingestão de energia reduzida. Também foi confirmado pela ANOVA de dois fatores, onde o tratamento com telmisartana representou 55,85% da variância total ($P < 0,0001$) contra apenas 6,33% de losartana ($P = 0,0025$). Não houve interação entre dieta e tratamento quanto à MC final, mas a dieta também influenciou a MC de forma independente (ANOVA de dois fatores, $P < 0,0001$).

Figura 14 – Massa corporal pré-tratamento (10ª semana de intervenção dietética) e pós-tratamento (última semana de tratamento, 5ª semana)

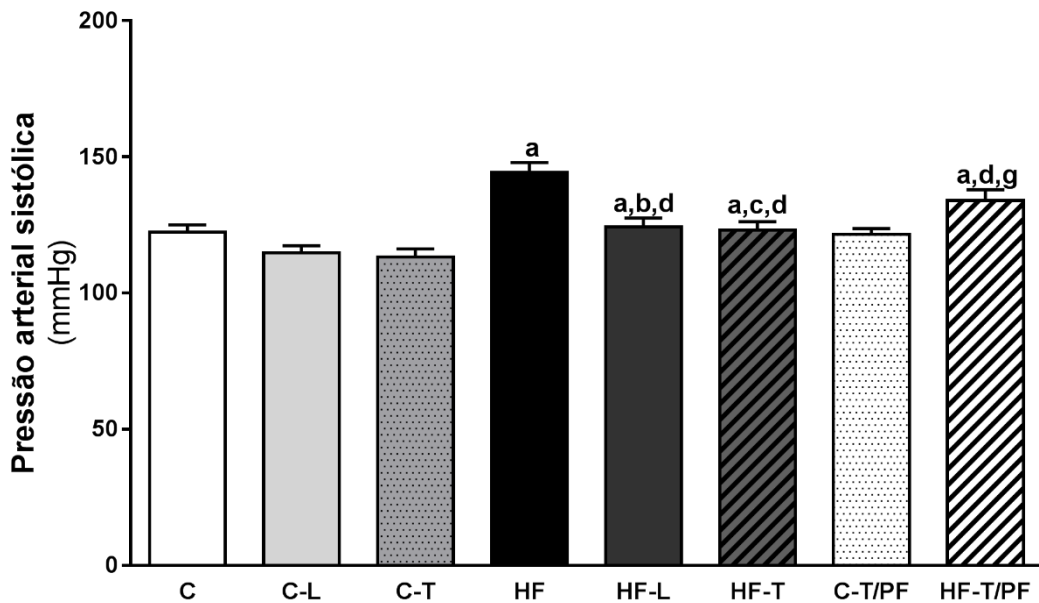


Legenda: Os dados são apresentados como média \pm DP, (n=5). Grupos: dieta controle (C), C tratado com losartana (C-L), C tratado com telmisartana (C-T), dieta rica em gordura (HF), HF tratado com losartana (HF-L), HF tratado com telmisartana (HF-T); C não-tratado telmisartana, *pair-fed* (C-T / PF) e HF não-tratado telmisartana, *pair-fed* (HF-T / PF). $P < 0,05$ quando comparado com o grupo C [a], grupo C-L [b], grupo C-T [c], grupo HF [d], grupo HF-L [e], grupo HF-T [f] e C-T / PF [g].

4.2 Pressão arterial sistólica

Quanto à pressão arterial sistólica (PAS), o grupo HF apresentou valores mais elevados de PAS que o grupo C (+16%, $P < 0,0001$). O tratamento com losartana e telmisartana atenuaram os níveis de PAS nos grupos HF tratados quando comparado com o grupo HF (- 8%, $P < 0,0001$, para HF-L e HF-T). O grupo HF-T / PF apresentou valores de PAS reduzidos em relação ao HF (-4%, $P = 0,0426$), porém valores superiores ao grupo C (+10%, $P < 0,0001$) e C-T/PF (+10%, $P < 0,0001$) conforme a figura 15. Dieta e tratamento independentemente influenciam nos valores da PAS, sem interagir significativamente (ANOVA de dois fatores, $P < 0,0001$).

Figura 15 – Pressão arterial sistólica (PAS)

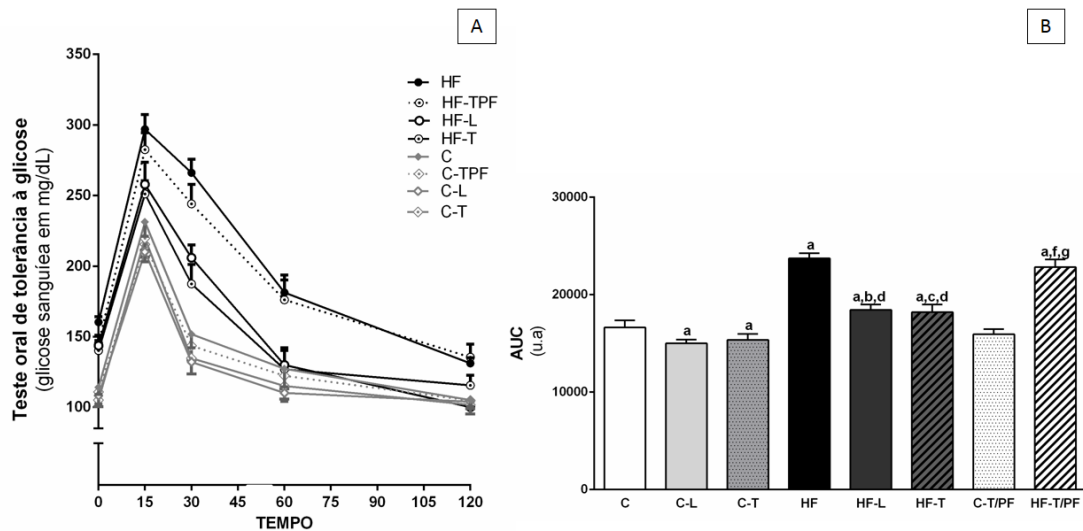


Legenda: Os dados são apresentados como média \pm DP, (n=5). Grupos: dieta controle (C), C tratado com losartana (C-L), C tratado com telmisartana (C-T), dieta rica em gordura (HF), HF tratado com losartana (HF-L), HF tratado com telmisartana (HF-T); C não-tratado telmisartana, *pair-fed* (C-T / PF) e HF não-tratado telmisartana, *pair-fed* (HF-T / PF). $P < 0,05$ quando comparado com o grupo C [a], grupo C-L [b], grupo C-T [c], grupo HF [d], grupo HF-L [e], grupo HF-T [f] e C-T / PF [g].

4.3 Parâmetros metabólicos

O teste de tolerância oral à glicose demonstrou que o grupo HF é intolerante à glicose, mostrando maior AUC do que para o grupo C (+42%, $P < 0,0001$). Ambos os tratamentos apresentaram diminuição da AUC (HF-L-22%, $P < 0,0001$; HF-T -23%, $P < 0,0001$). Contudo, estes valores permaneceram maiores que os do grupo C. Quanto ao grupo HF-T / PF, não tratado, o mesmo mostrou uma maior AUC do que o grupo HF-T (+25%, $P < 0,0001$), o que reforça que o tratamento com telmisartana exerceu novamente uma influência mais pronunciada do que a ingestão de energia reduzida no que se refere ao tratamento da intolerância à glicose, uma vez que o grupo HF-T / PF, não tratado, permaneceu intolerante à glicose. Tanto a dieta quanto o tratamento interagiram para determinar a AUC, mas a dieta e o tratamento também influenciam a AUC de forma independente (ANOVA de dois fatores, $P < 0,0001$). Os resultados da AUC encontram-se na figura 16 A e B.

Figura 16 - Teste de tolerância oral à glicose (A) e AUC (B)

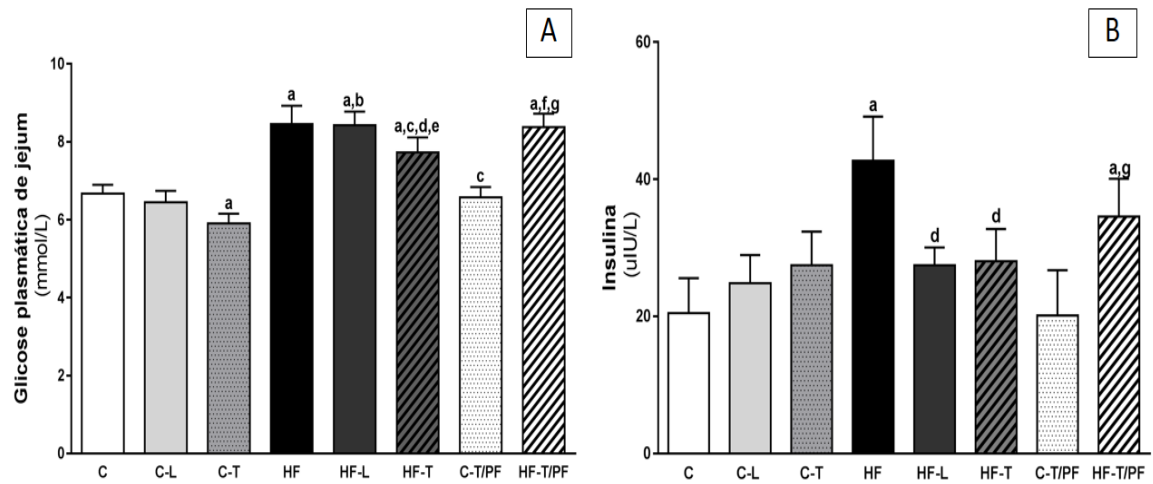


Legenda: Os dados são apresentados como média \pm DP, (n=5). Grupos: dieta controle (C), C tratado com losartana (C-L), C tratado com telmisartana (C-T), dieta rica em gordura (HF), HF tratado com losartana (HF-L), HF tratado com telmisartana (HF-T); C não-tratado telmisartana, *pair-fed* (C-T / PF) e HF não-tratado telmisartana, *pair-fed* (HF-T / PF). $P < 0,05$ quando comparado com o grupo C [a], grupo C-L [b], grupo C-T [c], grupo HF [d], grupo HF-L [e], grupo HF-T [f] e C-T / PF [g].

Quanto aos níveis de glicemia em jejum, não houve diferença entre o grupo HF-L e HF. Apesar do grupo HF-T exibir níveis mais baixos de glicose em jejum do que os grupos HF (-9%, $P = 0,0180$) e HF-L (-8%, $P = 0,0245$), ainda era maior que o grupo C. Os grupos *pair-feeding*, não tratados, apresentaram níveis de glicose em jejum mais elevado quando comparado com as suas contrapartes (C-T / PF, + 12% quando comparado a C-T, $P = 0,0290$ e HF-T / PF, + 9% quando comparado a HF-T, $P = 0,0346$), em relação ao grupo HF-T/PF e o grupo HF não houve diferença. A dieta exerceu uma influência significativa sobre o nível de glicose em jejum (ANOVA de dois fatores, $P < 0,0001$), mas apenas o tratamento com telmisartana influenciou significativamente esse parâmetro (representou 15% da variância total, ANOVA de dois fatores, $P = 0,0001$). Os níveis de glicose em jejum estão representados na Figura 17A.

Com relação à insulina, foi observado níveis mais elevados no grupo HF do que no grupo C (+115%, $P < 0,0001$) e os grupos tratados HF-L e HF-T mostraram uma redução significativa nos níveis de insulina quando comparados ao grupo HF (-37% , $P < 0,0001$ e -35%, $P = 0,0002$; respectivamente), com níveis semelhantes as suas contrapartes (C-L e C-T). Quanto ao grupo HF-T / PF, não tratado, o mesmo mostrou níveis mais elevados semelhantes ao grupo HF, conforme a figura 17B.

Figura 17- Glicemia plasmática de jejum (A) e insulina plasmática (B)



Legenda: Os dados são apresentados como média \pm DP, (n=5). Grupos: dieta controle (C), C tratado com losartana (C-L), C tratado com telmisartana (C-T), dieta rica em gordura (HF), HF tratado com losartana (HF-L), HF tratado com telmisartana (HF-T); C não-tratado telmisartana, *pair-fed* (C-T / PF) e HF não-tratado telmisartana, *pair-fed* (HF-T / PF). P < 0,05 quando comparado com o grupo C [a], grupo C-L [b], grupo C-T [c], grupo HF [d], grupo HF-L [e], grupo HF-T [f] e C-T / PF [g].

5 RESULTADOS TECIDO ADIPOSEO

Neste bloco, serão abordados os resultados do tecido adiposo branco subcutâneo (TABs) relacionado ao tratamento com losartana, visto que, esta foi a única intervenção capaz de promover a diferenciação dos adipócitos maduros no TABs em células bege.

5.1 Remodelamento do tecido adiposo

O grupo HF apresentou maior índice de adiposidade do que o grupo C (+ 54,4%, $P < 0,0001$, tabela 4) e a dieta representou 47,83% de sua variação total (ANOVA de dois fatores, $P = 0,0002$). Por outro lado, o índice de adiposidade reduzido foi observado no grupo HF-L após o tratamento (-23,5% do que o grupo HF, $P < 0,0001$, tabela 4), que representaram 15,62% da variância total (ANOVA de dois fatores, $P = 0,0138$).

O grupo HF mostrou maior área de seccional transversa de adipócitos, juntamente com menor QUICKI do que o grupo C (+ 109%, $P < 0,0001$ e -11,5%, $P < 0,0001$). Por outro lado, uma reduzida área seccional transversa de adipócitos no grupo HF-L está em conformidade com a melhora do QUICKI quando comparado ao grupo HF (-68%, $P < 0,0001$ e + 7,3%, $P = 0,0017$), confirmando que os pequenos adipócitos são mais sensíveis à insulina. Tanto a dieta quanto o tratamento influenciaram a área seccional transversa de adipócitos de forma independente (ANOVA de dois fatores, $P = 0,0008$ para dieta e $P < 0,0001$ para tratamento, este último representou 48,81% da variância total), além de interagir significativamente (ANOVA de dois fatores, $P = 0,0209$). Além disso, a losartana interagiu com a dieta HF para restaurar a sensibilidade à insulina em HF-L (ANOVA dois fatores, $P = 0,0003$). A Figura 18 e a tabela 4 detalham esses achados.

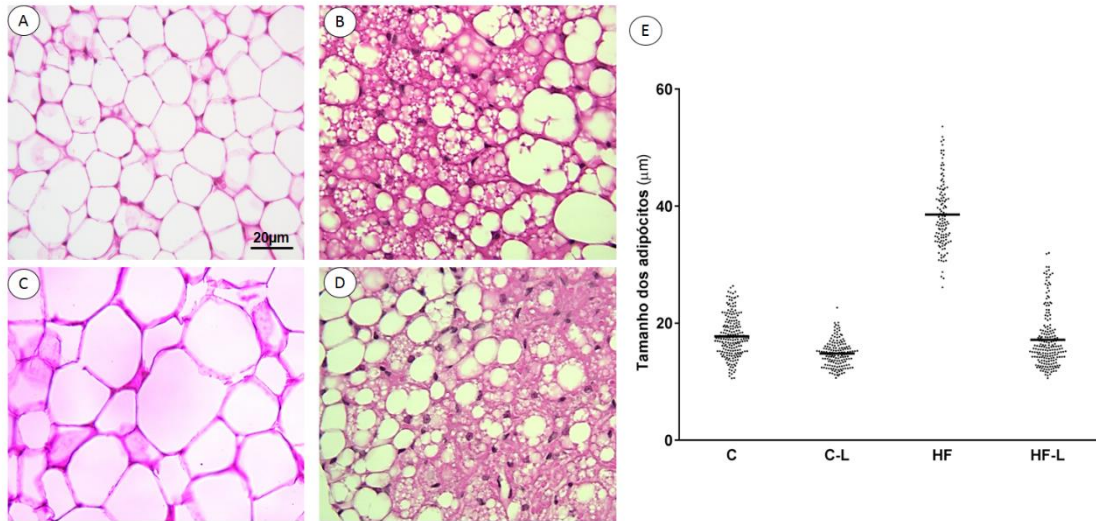
Tabela 4 - Metabolismo de carboidratos e remodelamento do tecido adiposo

Dados	C	C-L	HF	HF-L
Adiposidade				
QUICKI	0,296±0,011	0,287±0,007	0,262±0,004 ^{a,b}	0,281±0,001 ^c
Índice de adiposidade (%)	2,48±0,15	2,18±0,37	3,83±0,63 ^a	2,93±0,62 ^c
Remodelamento do TABs				
Gordura inguinal (g)	0,25±0,06	0,17±0,05	0,36±0,05 ^a	0,31±0,06 ^b
Área seccional adipócitos(µm ²)	249±81,87	104,1±18,93 ^a	519,7±140,8 ^a	167,0±77,48 ^c

Legenda: Os valores são apresentados como média ± DP, n = 5. As diferenças significativas entre os grupos são indicadas por símbolos (P <0,05): a ≠ C, b ≠ C-L e c ≠ HF. Grupos: C (grupo de controle); C-L (grupo controle tratado com losartana); HF (grupo com alto teor de gordura) e HF-L (grupo com alto teor de gordura tratado com losartana).

Na figura 18 são demonstradas as fotomicrografias dos adipócitos brancos uniloculares de tamanho normal no grupo C (A), enquanto o grupo HF (B) apresentou adipócitos brancos uniloculares grandes. Embora o losartana não tenha reduzido a massa de gordura inguinal (tabela 4), os grupos C-L (C) e HF-L (D) exibiram adipócitos bege multiloculares localizados entre os adipócitos brancos uniloculares de tamanho normal, o que implica que o tratamento provocou o fenômeno *browning*.

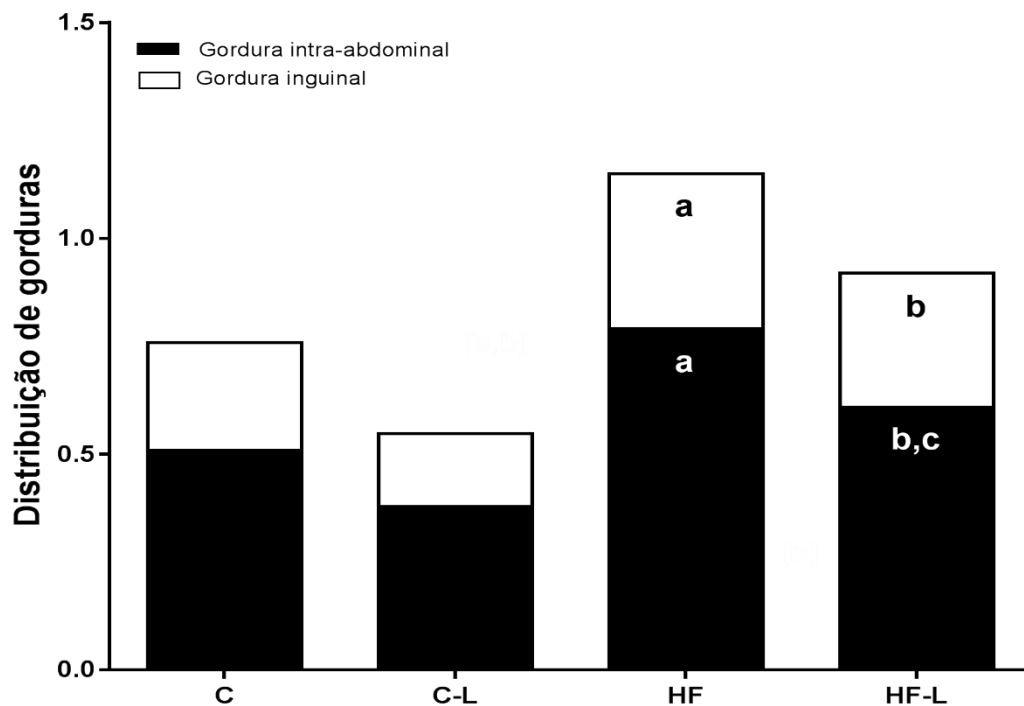
Figura 18 - Histologia de tecido adiposo branco subcutâneo e distribuição de tamanho



Legenda: Histologia do tecido adiposo branco subcutâneo, lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina, barra de escala = 20 µm. Adipócitos brancos de tamanho normal no grupo C (A); Adipócitos hipertrofiados em animais obesos não tratados do grupo HF (C); Adipócitos bege multiloculares em adipócitos brancos inguinais no grupo C-L (B); Adipócitos bege multiloculares em adipócitos brancos de tamanho normal no grupo HF-L (D); Distribuição de tamanho de adipócitos, mostrando hipertrofia de adipócitos no grupo HF, enquanto que ambos os grupos tratados apresentaram tamanho de adipócitos semelhante ao grupo controle (E). Grupos: C (grupo de controle); C-L (grupo controle tratado com losartana); HF (grupo com alto teor de gordura) e HF-L (grupo com alto teor de gordura tratado com losartana).

Observou-se ainda que os compartimentos de gorduras intra-abdominal e subcutânea (inguinal) foram significativamente mais pesadas no grupo HF do que no grupo C (+55%, $P=0,0013$ e + 44%, $P = 0,0471$, respectivamente). Por outro lado, o grupo HF-L apresentou diminuição do compartimento de gordura intra-abdominal em comparação com o grupo HF (-23%, $P=0,0057$). A distribuição das gorduras está detalhada na figura 19.

Figura 19- Distribuição das gorduras intra-abdominal e subcutânea



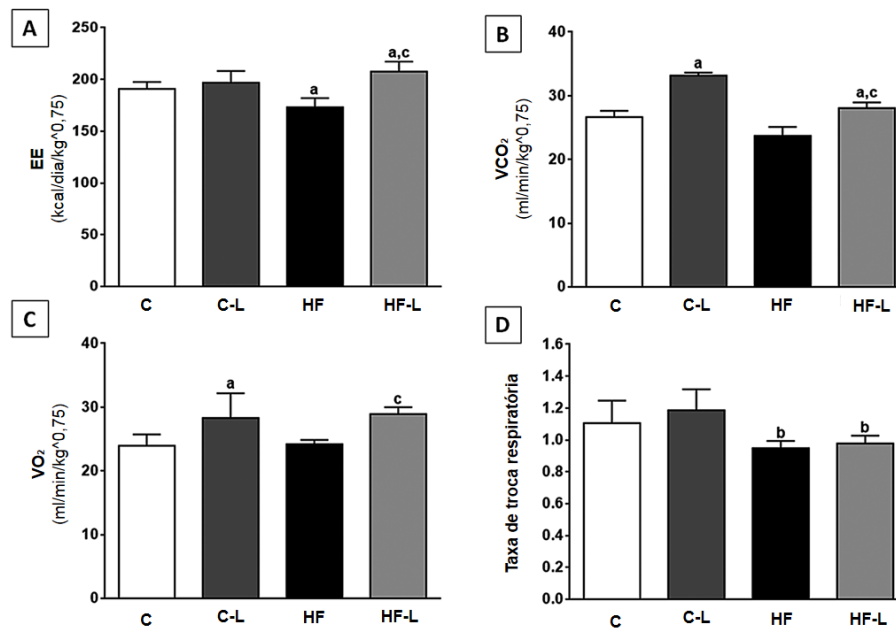
Legenda: Os valores são apresentados como média \pm DP, n = 5. As diferenças significativas entre os grupos são indicadas por símbolos ($P < 0,05$): a \neq C, b \neq C-L e c \neq HF. Grupos: C (grupo de controle); C-L (grupo controle tratado com losartana); HF (grupo com alto teor de gordura) e HF-L (grupo com alto teor de gordura tratado com losartana).

5.2 Gasto energético e calorimetria indireta

O grupo HF apresentou gasto energético (EE) mais baixo do que o grupo C (-9,28%, $P = 0,0298$), enquanto o tratamento com losartana produziu maior EE no grupo HF-L do que no grupo HF (+ 19,93%, $P = 0,0001$). Apenas o tratamento exerceu uma influência significativa no EE, representando 45,8% de sua variância total (ANOVA de dois fatores, $P = 0,0002$), além de interagir significativamente com a dieta para determinar os valores de EE (ANOVA de dois fatores, $P = 0,0034$). A figura 20A ilustra esses achados.

Ambos os grupos (C-L e HF-L) apresentaram maior VCO₂ do que suas contrapartes (C-L: + 24,54%, $P < 0,0001$ e HF-L: + 18,40%, $P < 0,0001$, Figura 20B). Similarmente, os animais tratados C-L e HF-L, apresentaram VO₂ maior do que os grupos não tratados (C-L + 18,24%, $P = 0,0407$ e HF-L: + 19,52%, $P = 0,0180$, Figura 20C). O RQ foi de 0,9 em ambos os grupos HF (figura 20D).

Figura 20 – Gasto Energético – EE (a); Produção de dióxido de carbono (b); Captação de oxigênio (c); Taxa de troca respiratória (d)



Legenda: Os valores são apresentados como média \pm DP, $n = 5$. As diferenças significativas entre os grupos são indicadas por símbolos ($P < 0,05$): $a \neq C$, $b \neq C-L$ e $c \neq HF$. Grupos: C (grupo de controle); C-L (grupo controle tratado com losartana); HF (grupo com alto teor de gordura) e HF-L (grupo com alto teor de gordura tratado com losartana). Abreviações: EE - gasto energético; VCO₂ - Produção de dióxido de carbono; VO₂ - absorção de oxigênio.

ANOVA de dois fatores revelou que o tratamento representou 58,91% e 56,35% da variância total em relação ao VCO₂ e VO₂, influenciando ambos os parâmetros ($P < 0,0001$ e $P = 0,0003$). A dieta exerceu influência isoladamente, além de interagir significativamente com o tratamento apenas para determinar os valores de VCO₂ (ANOVA de dois fatores, $P < 0,0001$ e $P = 0,027$). A dieta representou 47,17% da variação total em relação ao RQ, exercendo uma influência significativa nela (ANOVA de dois fatores, $P = 0,0011$).

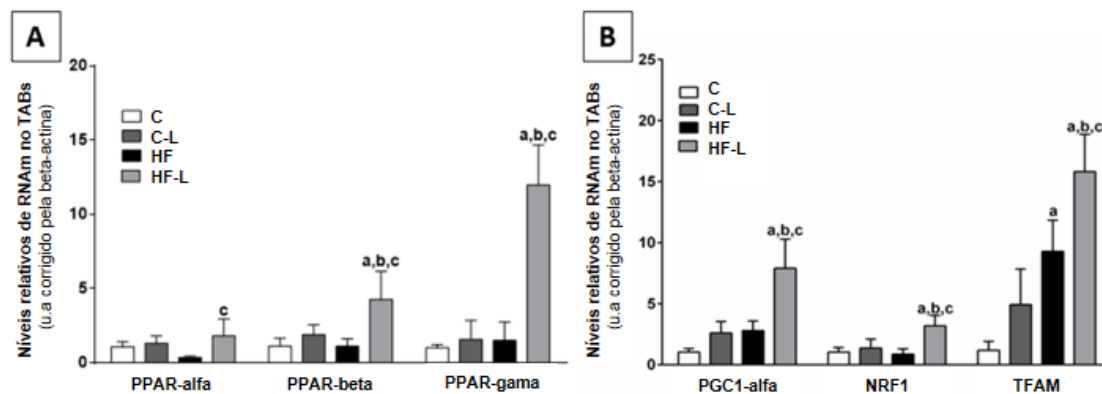
5.3 PCR quantitativo em tempo real

5.3.1 Expressão gênica dos PPARs

O tratamento com losartana aumentou a expressão do gene PPAR-alfa no grupo HF-L quando comparado com o grupo HF (+ 409,86%; $P = 0,00415$). Da mesma forma, houve o aumento da expressão dos genes PPAR-beta e PPAR-gama no grupo HF-L quando

comparado ao grupo HF (PPAR-beta: + 284,39%; $P = 0,0052$ e PPAR-gama: + 551,87%; $P = 0,0014$). O aumento dos níveis dos genes das isoformas de PPARs no grupo HF-L foi diretamente relacionado à expressão melhorada do gene PGC1-alfa neste grupo quando comparado ao grupo HF (+ 182,14%; $P = 0,0022$). ANOVA de dois fatores mostrou que apenas o tratamento exerceu uma influência significativa na expressão do gene PPAR-alfa ($P = 0,009$). Por outro lado, tanto o tratamento quanto a dieta, isoladamente, influenciaram significativamente expressões gênicas do PPAR-beta ($P = 0,0008$ para o tratamento e $P = 0,0256$ para a dieta), PPAR-gama ($P < 0,0001$ para ambas as variáveis) e PGC1-alfa ($P < 0,0001$ para ambas as variáveis). Além disso, houve uma interação significativa entre dieta e tratamento para determinar esses desfechos ($P = 0,0246$ para PPAR-beta, $P < 0,0001$ para PPAR-gama e $P = 0,0101$ para PGC1-alfa). Os resultados relacionados à expressão dos genes PPARs são retratados nas figuras 21A e 21B.

Figura 21 - Expressão genética das isoformas de PPAR (A); PGC1-alfa, NRF1 e TFAM (B) no tecido adiposo branco subcutâneo



Legenda: A beta-actina foi utilizada como controle endógeno para normalizar a expressão dos genes selecionados: Os valores são apresentados como média \pm DP, $n = 5$. As diferenças significativas entre os grupos são indicadas por símbolos ($P < 0,05$): $a \neq C$, $b \neq C-L$ e $c \neq HF$. Grupos: C (grupo controle); C-L (grupo controle tratado com losartana); HF (grupo com alto teor de gordura) e HF-L (grupo com alto teor de gordura tratado com losartana). Abreviações: Receptor ativador de proliferação peroxissomal (PPAR), PPAR-alfa, PPAR-beta/delta, PPAR-gama, coativador-1 alfa do ativador de proliferação peroxissomal gama (PGC1- α), Fator respiratório nuclear 1 (NRF1) e Fator de transcrição mitocondrial A (TFAM).

Em conformidade com a expressão do PGC1-alfa, o aumento da expressão do gene NRF1 foi detectado no grupo HF-L quando comparado ao grupo HF (+ 265,05%; $P = 0,0047$). Os níveis do gene NRF1 foram significativamente influenciados pela dieta e tratamento, individualmente (ANOVA de dois fatores, $P = 0,0095$ e $P = 0,0003$) e também

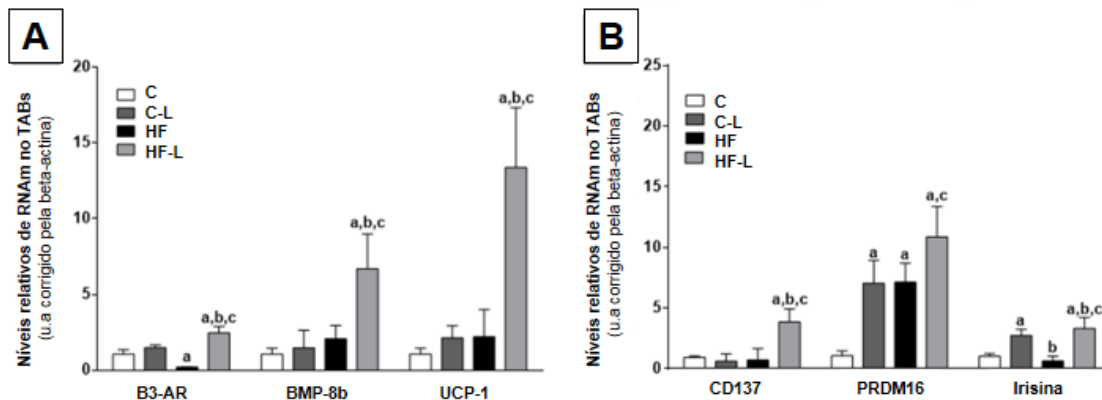
por uma interação entre essas duas variáveis (ANOVA de dois fatores, $P = 0,0028$). Da mesma forma, o TFAM, um marcador de biogênese mitocondrial, foi aumentado no grupo HF-L quando comparado ao grupo HF (+ 70,46%; $P = 0,0244$). Tanto a dieta como o tratamento tiveram uma influência significativa na expressão do gene TFAM (ANOVA de dois fatores, $P < 0,0001$ e $P = 0,0003$), sem interagir significativamente. A Figura 21B ilustra os achados relacionados à biogênese mitocondrial.

5.3.2 Expressão de genes termogênicos

O gene $\beta 3$ -AR, iniciador da via termogênica, apresentou maior expressão no grupo HF-L que no grupo HF (+ 1075,23%; $P < 0,0001$, figura 21A). Por outro lado, os animais HF mostraram uma redução significativa na expressão gênica de $\beta 3$ -AR quando comparado ao grupo C (-80%, $P < 0,0001$). A ANOVA de dois fatores confirmou que apenas o tratamento influenciou esse parâmetro como único estímulo ($P < 0,0001$), além de interagir com a dieta ($P < 0,0001$).

A expressão do gene BMP-8b foi maior no grupo HF-L do que no grupo HF (+ 352,70%; $P = 0,0295$, figura 22A). Este parâmetro foi significativamente influenciado pela dieta (ANOVA de dois fatores, $P = 0,0001$), pelo tratamento (ANOVA de dois fatores, $P = 0,0008$) e pela interação entre essas duas variáveis (ANOVA de dois fatores, $P = 0,0034$). Da mesma forma, o tratamento com losartana provocou um aumento significativo na expressão do gene UCP1 no grupo HF-L em comparação com o grupo HF (+ 504,84%; $P = 0,0001$), implicando na termogênese adaptativa. De acordo com ANOVA de dois fatores, a expressão do gene UCP1 foi significativamente influenciada pela dieta e pelo tratamento como estímulo isolado ($P < 0,0001$) e pela interação entre eles ($P = 0,0001$). Estes resultados são mostrados na figura 22A.

Figura 22 - Expressão gênica de B3-AR, BMP8-b, UCP1 (A) e CD137, PRDM16, Irisina (B) no tecido adiposo branco subcutâneo



Legenda: A beta-actina foi utilizada como controle endógeno para normalizar a expressão dos genes selecionados: Os valores são apresentados como média \pm DP, n = 5. As diferenças significativas entre os grupos são indicadas por símbolos ($P < 0,05$): a \neq C, b \neq C-L e c \neq HF. Grupos: C (grupo de controle); C-L (grupo controle tratado com losartana); HF (grupo com alto teor de gordura) e HF-L (grupo com alto teor de gordura tratado com losartana). Abreviações: Receptor Beta 3 adrenérgico (β 3-AR), proteínas morfogenéticas ósseas -8b (BMP-8b), Domínio PR contendo 16 (PRDM16), Fibronectina tipo III contendo proteína 5 (FNDC5)/irisina, Termogenina (UCP1) e CD137 (*cluster* de diferenciação 137).

O grupo HF-L apresentou níveis aumentado do gene CD137 quando comparado ao grupo HF (+ 445,20%; $P = 0,0023$), confirmando a presença de adipócitos da linhagem bege. De acordo com esta observação, a expressão do gene PRDM16, que é essencial para a manutenção dos adipócitos bege, foi significativamente aumentada em ambos os grupos tratados quando comparados aos seus homólogos. C-L e HF-L mostraram um aumento de +553,68% e +884,21% em comparação com o grupo C ($P = 0,0279$ e $P = 0,0043$), e HF-L apresentou aumento de +52% quando comparado com o grupo HF ($P = 0,0286$), sugerindo a presença de adipócitos bege ativos nos grupos tratados. Os resultados do CD137 e PRDM16 encontram-se na figura 22B. Tanto CD137 como PRDM16 foram independentemente influenciados pela dieta ($P = 0,0006$ e $P < 0,0001$) e tratamento ($P = 0,0010$ e $P < 0,0001$). No entanto, apenas o CD137 foi significativamente influenciado por uma interação entre essas duas variáveis ($P = 0,0001$).

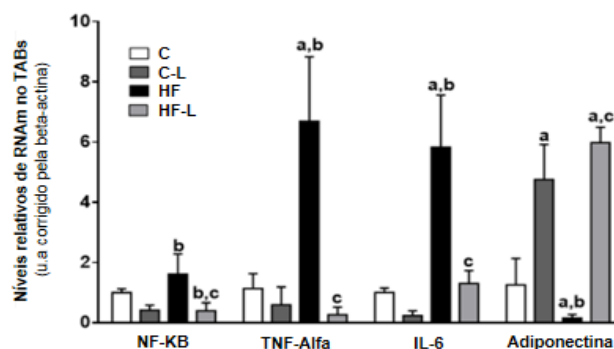
Em relação à irisina, os grupos HF-L e C-L exibiram maiores níveis da expressão do gene FNDC5 / irisina do que os grupos HF (+ 410,26%; $P = 0,0014$) e C (+ 166,88%; $P = 0,0090$). ANOVA de dois fatores confirmou que apenas o tratamento influenciou os níveis

dos genes FNDC5 / irisina e representou 79,26% de sua variação total ($P < 0,0001$). A Figura 22B ilustra essas descobertas.

5.3.3 Expressão de genes relacionados à inflamação

O tratamento com losartana atenuou a inflamação do grupo HF-L. No grupo HF qual foi observado um aumento expressivo dos genes NF-KB, TNF-alfa e IL-6 quando comparado com o grupo HF-L (+ 2348,96%; $P = 0,0001$; + 298,33%; $P = 0,0176$ e + 344,24%; $P = 0,0003$, respectivamente). Em contrapartida, a expressão de adiponectina foi maior no C-L e HF-L do que nas suas contrapartes (+276,64%, $P < 0,0001$ e +3689,87%; $P < 0,0001$), implicando no efeito antiinflamatório do tratamento proposto. A ANOVA de dois fatores mostrou que apenas o tratamento, como único estímulo, influenciou nos níveis dos genes NF-KB e adiponectina ($P < 0,0001$), enquanto tanto a dieta como o tratamento influenciaram os níveis dos genes TNF-alfa e IL-6 ($P < 0,0001$). As interações entre dieta e tratamento foram significativamente influenciadas pela adiponectina ($P = 0,004$), TNF-alfa ($P < 0,0001$) e IL-6 ($P = 0,0003$). A Figura 23 detalha esses achados.

Figura 23 - Expressão genética de NF-KB, TNF-alfa, IL-6 e adiponectina no tecido adiposo branco subcutâneo

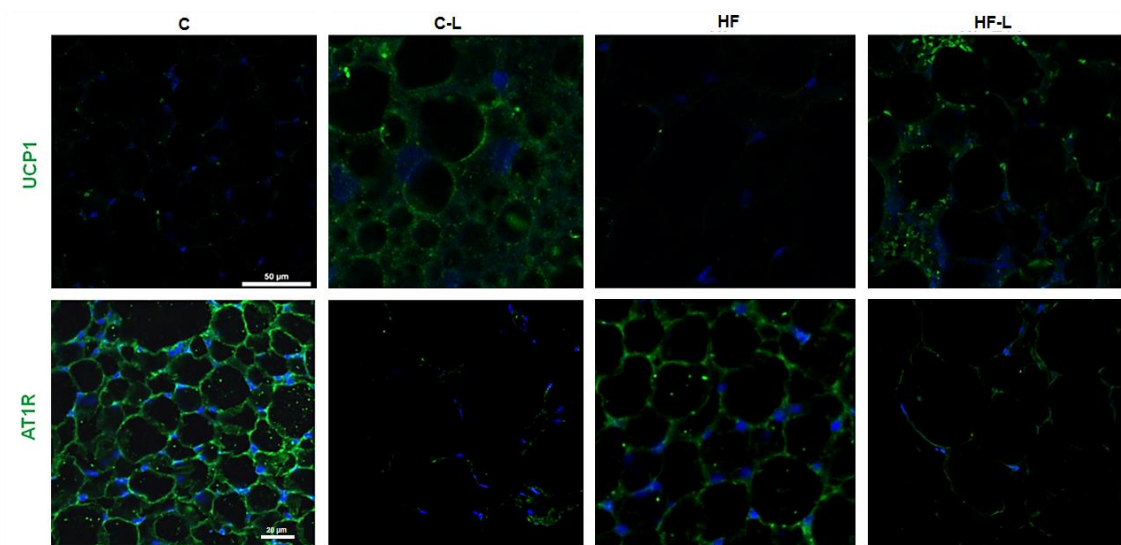


Legenda: A beta-actina foi utilizada como controle endógeno para normalizar a expressão dos genes selecionados: Os valores são apresentados como média \pm DP, $n = 5$. As diferenças significativas entre os grupos são indicadas por símbolos ($P < 0,05$): $a \neq C$, $b \neq C-L$ e $c \neq HF$. Grupos: C (grupo de controle); C-L (grupo controle tratado com losartana); HF (grupo com alto teor de gordura) e HF-L (grupo com alto teor de gordura tratado com losartana). Abreviações: Fator nuclear kappa b (NF-KB), Interleucina 6 (IL-6) e Fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa).

5.4 Imunofluorescência do tecido adiposo branco subcutâneo

A imunofluorescência para UCP1 revelou uma imunomarcagem positiva em ambos os grupos tratados, o que confirma que além de uma expressão aumentada do gene UCP1, o tratamento com losartana permitiu a expressão positiva de proteína UCP1 em animais tratados, independentemente das suas dietas. Além disso, os animais tratados com losartana apresentaram imunomarcagem negativa para o receptor AT1 da angiotensina 2, confirmando a ação do fármaco nos animais tratados. Estes resultados estão representados na figura 24 e asseguram a existência de células bege no TABs após o tratamento com losartana.

Figura 24 - Imunofluorescência para UCP1 e AT1R no tecido adiposo branco subcutâneo (TABs)



Legenda: Parte superior: o grupo C mostrou a ausência de células UCP1 positivas no TABs, bem como no grupo HF. O contrário foi observado no grupo C-L que apresentou abundantes células UCP1 positivas (verde) no citoplasma. Do mesmo modo, foi encontrada imunomarcagem positiva para UCP1 (verde) no grupo HF-L. A mesma ampliação para todas as fotomicrografias, barra de escala = 50 µm. Painel inferior: o grupo C e o grupo HF mostraram imunorreações positivas para AT1R, enquanto ambos os grupos de tratamento (C-L e HF-L) mostraram ausência de reação positiva para AT1R. O bloqueio da reação correlacionou-se com a expressão aumentada de UCP1. A mesma ampliação para todas as fotomicrografias, barra de escala = 20 µm. Abreviações: UCP1 (proteína de desacoplamento 1); AT1R (receptor de angiotensina II tipo 1) Grupos: C (grupo de controle); C-L (grupo controle tratado com losartana); HF (grupo com alto teor de gordura) e HF-L (grupo com alto teor de gordura tratado com losartana).

6 DISCUSSÃO DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO SUBCUTÂNEO

Nossos resultados mostram novos efeitos pleiotrópicos relacionados à losartana em camundongos obesos. Os animais alimentados com dieta HF tratados cronicamente com losartana exibiram MC e índice de adiposidade reduzidos, embora com a mesma ingestão de energia que os animais não tratados. Estes achados foram acompanhados por sensibilidade aumentada à insulina, juntamente com uma área de seccional transversa dos adipócitos reduzida, que está em conformidade com a indução de adipócitos beges entremeados em adipócitos brancos inguinais nos animais HF-L. Estes animais também exibiram maior EE acompanhado da presença de adipócitos multiloculares positivos para UCP1 com níveis aumentados dos genes PGC1-alfa e PRDM16, indicando um potencial significativo para biogênese mitocondrial e termogênese não ligada ao tremor.

É amplamente descrito que a ingestão crônica de dieta hiperlipídica causa excesso de peso nos animais (Fraulob, Ogg-Diamantino et al. 2010, Souza-Mello, Gregorio et al. 2010). No entanto, o tratamento com losartana foi capaz de reduzir a MC no grupo HF-L, o que é explicado pelo aumento do EE após a intervenção. A telmisartana, é frequentemente associado à perda de massa corporal e perda de gordura corporal em modelos animais de obesidade, o que é secundário a uma redução da ingestão de energia devido aos efeitos relacionados ao PPAR-beta no restabelecimento da saciedade, induzindo a um maior EE e UCP1 (He, Yang et al. 2010, Penna-de-Carvalho, Graus-Nunes et al. 2014).

Em relação ao consumo de energia, um trabalho anterior mostrou que a losartana, com uma dose mais alta (30 mg / Kg), causou uma redução significativa na ingestão de alimentos (Smith, Hindmarch et al. 2014). Por outro lado, na dose translacional de 10 mg / Kg, que corresponde a uma dose única de 50 mg / dia em um adulto com MC de 70 Kg (Reagan-Shaw, Nihal et al. 2008), a losartana não alterou a ingestão de energia, o que corrobora com os achados, uma vez que os animais conseguiram reduzir a MC mesmo com consumo excessivo de ingestão em energia quando comparado aos grupos controle. Esta observação descarta a necessidade de um grupo de alimentação *pair-feeding* e destaca a importância da termogênese adaptativa para alcançar um balanço energético negativo e a perda de MC após o tratamento proposto, pois os animais HF-L exibiram maior EE entre os grupos.

A dieta HF não só causou sobrepeso, como também aumentou o índice de adiposidade. Apesar de provocar uma diminuição significativa no índice de adiposidade, a losartana não alterou o compartimento de gordura subcutânea, mais estável e menos relacionado com RI e comorbidades da obesidade do que o compartimento de gordura intra-abdominal (Hocking, Stewart et al. 2015). Esta observação prevê uma redução do acúmulo de gordura visceral, o que concorda com a sensibilidade aumentada à insulina e PAS reduzida (Hocking, Stewart et al. 2015). A ingestão em energia excessiva impulsiona a deposição de triacilglicerol em adipócitos hipertrofiados, que liberam leptina excessiva e desencadeiam hiperinsulinemia (Cerf 2007, Yadav, Kataria et al. 2013). A losartana diminuiu a área seccional transversa de adipócitos subcutâneos e normalizou o QUICKI, o que sugere que é necessário menos insulina para realizar o controle glicêmico.

A MC reduzida após o tratamento com losartana, sem qualquer alteração na ingestão de energia, sugere que alguns efeitos metabólicos apoiaram esses achados. Na verdade, a losartana aumentou EE, VO₂ e VCO₂, o que resultou em um RQ em torno de 0,9, indicando uso de carboidratos e lipídios como combustível para a manutenção do metabolismo (Arch and Trayhurn 2013). É importante ressaltar que os animais HF-L continuaram a ter livre acesso a uma dieta HF durante a fase de tratamento e, portanto, essa ingestão excessiva de lipídios pode ter sido metabolizada. Caso contrário, isso poderia resultar em ganho de MC como apresentado pelo grupo HF. A presença de adipócitos bege no TABs de animais tratados emerge como uma explicação viável para o fenótipo observado nesses animais, apesar da ingestão excessiva de energia a partir de ácidos graxos saturados (Kajimura 2015).

Os adipócitos bege são bastante diferentes dos adipócitos brancos. Eles se parecem com os adipócitos marrons, pois são multiloculares, exibem citoplasma grande e um maior número de mitocôndrias (Giralt and Villarroya 2013, Bartelt and Heeren 2014). Além de um padrão específico de expressão gênica, a biogênese mitocondrial é um importante substituto da formação de adipócitos beiges (Cedikova, Kripnerova et al. 2016). Por conseguinte, o fenômeno *browning* engloba a ativação de PPARs e seus efeitos a jusante, juntamente com a indução de PGC1-alfa, um forte preditor da biogênese mitocondrial, pois influencia os genes-chave envolvidos com esse fenômeno (Hondares, Rosell et al. 2011, Spiegelman 2013).

A losartana é um BRA, pois atua bloqueando o receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1R), além de ser capaz de inibir NF-KB e restaurar a atividade do PPAR-gama como descrito anteriormente para valsartan (Hasan, Ohmori et al. 2014). A inibição do fator de transcrição NF-KB provoca a redução da expressão do gene IL-6 e TNF-alfa, seus genes alvo, enquanto facilita a expressão da adiponectina (um gene alvo do PPAR-gama) (Palomer,

Alvarez-Guardia et al. 2009). Além disso, este novo padrão constitutivo de expressão do gene da adipocina leva a uma maior expressão do gene PGC1-alfa (Hasan, Ohmori et al. 2014).

O PGC1-alfa influencia os níveis do gene NRF1, que integra o núcleo com a mitocôndria pela ativação do TFAM (Scarpulla 2002). Este último inicia a replicação mitocondrial, o que maximiza a capacidade de desacoplamento de energia da célula (Piantadosi and Suliman 2006). Os níveis elevados da expressão dos genes NRF1 e TFAM após o tratamento com losartana sugerem atividade mitocondrial aumentada em adipócitos brancos subcutâneos, o que está especialmente relacionado à presença de adipócitos parecidos ao marrom neste compartimento (Piantadosi and Suliman 2006). O aumento relevante dos níveis do gene PGC1-alfa após o tratamento com losartana no TABs do grupo HF-L sugerem que um estímulo mais pronunciado para a biogênese mitocondrial é necessário para converter um adipócito branco em bege.

A mitocôndria tem um papel fundamental no desacoplamento de energia à medida que a UCP1 está localizada em sua membrana interna (Crowley and Vidal-Puig 2001). Na termogênese, o gradiente de prótons, gerado pela oxidação dos nutrientes no espaço interno da membrana da mitocôndria, é dissipado como calor a partir da ação da UCP1 ao invés de ser usado para síntese de ATP e armazenamento de energia (Lowell and Spiegelman 2000, Keipert and Jastroch 2014). O tratamento com losartana foi capaz de melhorar a expressão do gene e da proteína UCP1 de ambos os grupos tratados. A UCP1 geralmente é expressa no tecido adiposo marrom e sua verificação no TABs é uma das melhores formas de se avaliar a presença de adipócitos bege neste tecido (Spiegelman 2013). A expressão do gene UCP1 foi notavelmente aumentada no TABs no grupo HF-L, o que reafirma a contribuição dos adipócitos beges para os pontos finais avaliados neste experimento.

Entre as vias relacionadas, PPAR-alfa, PGC1-alfa, FNDC5 / irisina são susceptíveis de mediar e sustentar o *browning* em adipócitos brancos, como mostrado recentemente após o tratamento com fenofibrato em camundongos obesos, que também promoveu aumento da expressão do gene PPAR-beta (Rachid, Penna-de-Carvalho et al. 2015). Os genes alvos das isoformas PPAR-alfa e PPAR-beta favorecem a oxidação lipídica, colaborando para um fenótipo magro (Kersten, Desvergne et al. 2000). Além disso, a UCP1 é um gene alvo de ambas as isoformas de PPAR e é altamente influenciado pela presença de PGC1-alfa e FNDC5 / irisina (Bostrom, Wu et al. 2012). O último parece interagir com PPAR-alfa para intensificar a expressão e atividade da UCP1. Esses eventos garantem uma maior termogênese e EE, como observado em animais HF-L. Pode-se argumentar que os animais HF não apresentavam adipócitos bege, embora seus níveis de genes FNDC5 / irisina fossem

semelhantes ao grupo C. A irisina foi recentemente descrito como uma adipocina (Roca-Rivada, Castelao et al. 2013) e, portanto, uma resistência à sua ação pode acontecer em indivíduos obesos (Crujeiras, Pardo et al. 2015, Li, Yang et al. 2015), como descrito anteriormente para insulina e leptina em modelo de camundongo obeso (Kieffer and Habener 2000).

O PPAR-gama é essencial para a adipogênese e também influencia a expressão do gene PRDM16, que é considerado o regulador mestre da troca metabólica de gordura branca para marrom (Ohno, Shinoda et al. 2012, Seale 2015). Assim, a indução do PPAR-gama por losartana fornece um conhecimento essencial para a formação de células bege no TABs. Até a presente data, não há nenhum relato sobre a ativação do PPAR no TABs após o tratamento com losartana, nem há nenhum vínculo entre esse medicamento e o fenótipo *browning*. No entanto, nossos resultados estão em conformidade com outros achados da literatura onde a ativação de PPAR-gama por losartana exerceu efeitos hepatoprotetores em camundongos ou efeitos anti-inflamatórios em humanos (An, Nakajima et al. 2010, Koh, Yoon et al. 2013). Essas observações trazem novas perspectivas para os efeitos pleiotrópicos deste anti-hipertensivo amplamente prescrito e de baixo custo.

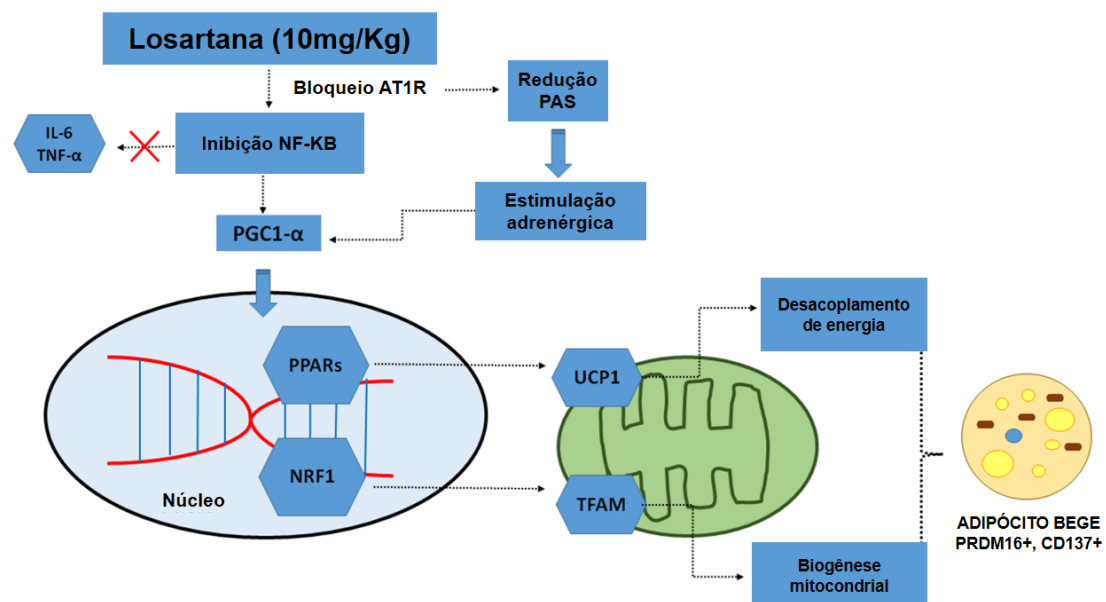
O PRDM16 promove a diferenciação de adipócitos marrons, mas tem um papel decisivo na manutenção de características marrons adquiridas por células bege durante o *browning* (Seale, Conroe et al. 2011). Os adipócitos marrons mantêm sua atividade termogênica e aparência multilocular com baixos níveis de PRDM16, pois PRDM3 também pode controlar uma identidade e uma função do TAM em adipócitos marrons pós-diferenciados (Harms, Ishibashi et al. 2014). No entanto, os adipócitos bege mudam para um fenótipo de adipócitos brancos quando o PRDM16 é suprimido (Cohen, Levy et al. 2014). Isso enfatiza a natureza reversível do fenótipo bege e do papel fundamental do PRDM16 para manutenção dos adipócitos bege e do seu potencial termogênico (Spiegelman 2013, Ishibashi and Seale 2015).

A termogênese adaptativa é facultativa e depende da estimulação do sistema nervoso simpático para ser desencadeada (Cannon and Nedergaard 2010). O β 3-AR, o principal receptor adrenérgico ligado à via da termogênese (Cypess, Weiner et al. 2015), foi mais afetado pelo tratamento com losartana no TABs, concordando com a transcrição UCP1 mais intensa no tecido e maior contribuição dos adipócitos bege para o controle da obesidade. Neste contexto, o BMP-8b atua centralmente, aumentando o estímulo simpático para o tecido adiposo marrom e, periféricamente, ampliando a resposta termogênica ao estímulo adrenérgico. O BMP-8b é induzido por PPAR-alfa, enquanto a ablação deste fator de

transcrição diminui a via termogênica no tecido adiposo marrom e torna os ratos mais propensos a obesidade induzida pela dieta (Chen, Zhao et al. 2004, Whittle, Carobbio et al. 2012). Em um estudo recente, o fenofibrato (agonista PPAR-alfa) foi descrito como indutor de adipócitos beges que favoreceram a via termogênica ligada à alta indução de BMP-8b e β 3-AR (Rachid, Penna-de-Carvalho et al. 2015). O PPAR-alfa pode ter um papel na promoção de uma resposta termogênica mais eficiente ao estímulo adrenérgico através da indução de BMP-8b.

Os adipócitos beges podem provir de um pré adipócito bege (progenitor MYF5⁻ ou linhagem muscular lisa MYH11⁻) ou de um adipócito branco maduro transdiferenciado (progenitor MYF5⁻, baixo CD137) (Sanchez-Gurmaches and Guertin 2014). O aumento do CD137, uma proteína de superfície celular bege-seletiva, é um importante indicador da presença de adipócitos bege pós-diferenciados (Wu, Bostrom et al. 2012). Além disso, sua presença sugere fortemente que as células são da linhagem bege, pois este gene é expresso especificamente por adipócitos bege maduros, sendo ausente em adipócitos brancos, bem como em seus derivados (Spiegelman 2013). A Figura 25 resume os resultados mais significativos.

Figura 25 - Esquema do mecanismo hipotetizado a formação dos adipócitos bege induzidos por losartana em um modelo alimentado com alto teor de gordura



Legenda: A Losartana bloqueia o AT1R com os seguintes efeitos a jusante: provoca inibição de NF-KB e reduz a transcrição genética de IL-6 e TNF-alfa; níveis reduzidos de PAS e estimulação de β 3-AR. Ambos os efeitos provocam aumento dos níveis do genes de PGC1- α , que está ligado aos PPARs e induz o gene NRF1. No núcleo, os PPARs (isoformas alfa e beta) estão relacionados à transcrição UCP1, que é surpreendentemente reforçada pela irisina. NRF1 provoca ativação de TFAM e biogênese mitocondrial. A expressão de UCP1 ectópica, juntamente com um número significativo de

mitocôndrias, caracteriza a formação de adipócitos bege. A isoforma PPAR-gama desempenha um papel crucial promovendo a estabilização dos níveis de genes PRDM16 aprimorados, o que mantém o fenótipo bege e o potencial termogênico dessas células, além de induzir a diferenciação de novos adipócitos bege CD137+. Abreviação: AT1R, receptor de angiotensina II tipo 1; PAS, pressão arterial sistólica; Receptor Beta 3 adrenérgico (β 3-AR), Fator nuclear kappa b (NF-KB), Interleucina 6 (IL-6), Fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa), Receptor ativador de proliferação peroxissomal (PPAR), coativador-1 alfa de proliferação peroxissomal gama (PGC1- α), Fator respiratório nuclear 1 (NRF1), Fator de transcrição mitocondrial A (TFAM), proteínas morfogenéticas ósseas-8b (BMP-8b), Domínio PR contendo 16 (PRDM16), Fibronectina tipo III contendo proteína 5 (FNDC5)/irisina, Termogenina (UCP1) e CD137 (*cluster* de diferenciação 137).

Fonte: A autora, 2016.

7 RESULTADOS DO PÂNCREAS

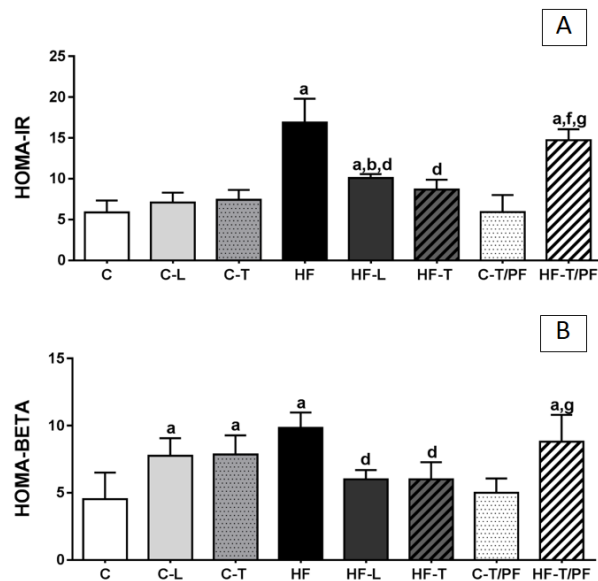
Os resultados de ingestão alimentar, MC, PAS e metabolismo de carboidratos foram demonstrados na sessão de resultados (pág. 73).

7.1 Índice HOMA (IR e BETA) e concentrações plasmáticas de GLP1

A partir dos níveis de insulina e de glicemia foi calculado o HOMA-IR, o qual apresentou-se elevado no grupo HF quando comparado com o grupo C (+188%, $P < 0,0001$). Por outro lado, os grupos HF-L e HF-T mostraram uma redução significativa no HOMA-IR quando comparado ao grupo HF (-41% e -49%, $P < 0,0001$ para ambos). Quanto aos grupos *pair-feeding*, o grupo HF-T / PF apresentou maior HOMA-IR do que o grupo HF-T (+72%, $P < 0,0001$), indicando resistência à insulina nesses animais. Os resultados são demonstrados na Figura 26A.

Da mesma forma, o HOMA-BETA foi maior no grupo HF do que no grupo C (+120, $P < 0,0001$), o que sugere hiperfunção das células beta. Os grupos tratados HF-L (-39%, $P = 0,0039$) e HF-T (-39%, $P = 0,0039$) mostraram uma redução significativa neste parâmetro, que é compatível com maior sensibilidade à insulina. Mais uma vez, o grupo HF-T / PF, não tratado, não apresentou diferença quando comparado ao grupo HF, destacando os efeitos benéficos do telmisartana na função da ilhota. Os resultados são apresentados na figura 26B. A dieta exerceu uma influência significativa sobre HOMA-IR e HOMA-BETA (ANOVA de dois fatores, $P < 0,0001$ e $P = 0,0044$), enquanto o tratamento influenciou apenas nos valores do HOMA-IR (ANOVA de dois fatores, $P < 0,0001$). No entanto, ambas as variáveis interagem para determinar ambos os índices (ANOVA de dois fatores, $P < 0,0001$).

Figura 26 – HOMA-IR (A) e HOMA-BETA (B)

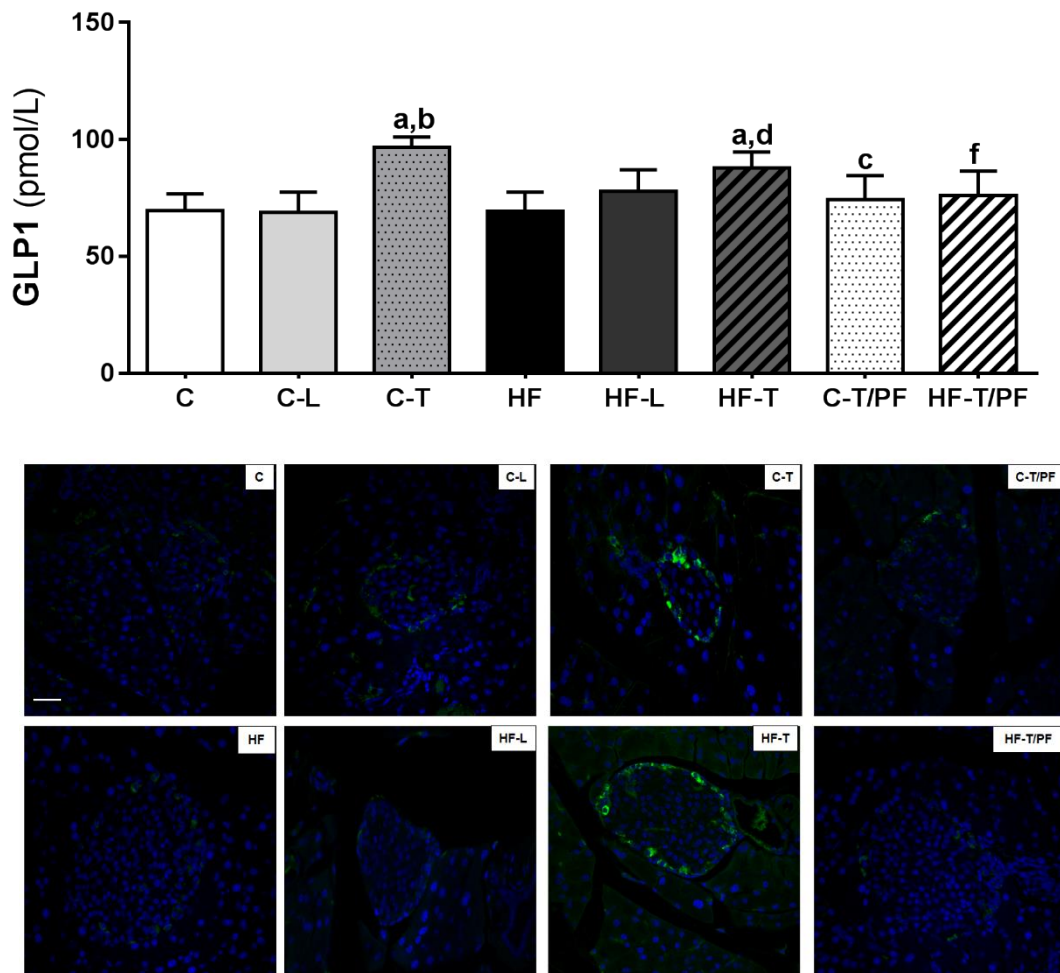


Legenda: Os dados são apresentados como média \pm DP, (n=5). Grupos: dieta controle (C), C tratado com losartana (C-L), C tratado com telmisartana (C-T), dieta rica em gordura (HF), HF tratado com losartana (HF-L), HF tratado com telmisartana (HF-T); C não-tratado telmisartana, *pair-fed* (C-T / PF) e HF não-tratado telmisartana, *pair-fed* (HF-T / PF). $P < 0,05$ quando comparado com o grupo C [a], grupo C-L [b], grupo C-T [c], grupo HF [d], grupo HF-L [e], grupo HF-T [f] e C-T / PF [g].

Os níveis de GLP1 também foram influenciados pelo tratamento com telmisartana, ambos os grupos tratados apresentaram maiores concentrações plasmáticas de GLP1 do que suas contrapartes (C-T, +39% em relação ao grupo C, $P = 0,0162$ e HF-T, +27% em relação ao grupo HF, $P = 0,0021$). A ingestão energética reduzida não foi capaz de alterar os níveis de GLP1, que permaneceram semelhantes no grupo C e HF e nos grupos C-T / PF e HF-T / PF. A ANOVA de dois fatores confirmaram essas descobertas demonstrando que apenas o tratamento com telmisartana mostrou uma influência significativa neste parâmetro (contabilizado para 74,34% da variância total, ANOVA de dois fatores, $P < 0,0001$).

Esses achados corroboram com a imunomarcagem positiva de GLP1 nas ilhotas pancreáticas nos grupos tratados com telmisartana, independentemente da dieta, confirmando que telmisartana aumenta os níveis plasmáticos de GLP-1 e a expressão de GLP-1 no pâncreas endócrino. Os níveis plasmático de GLP1 e as fotomicrografias de imunofluorescência são apresentadas na figura 27.

Figura 27 – Concentrações plasmáticas e imunofluorescência de GLP1



Legenda: Os dados são apresentados como média \pm DP, (n=5). Grupos: dieta controle (C), C tratado com losartana (C-L), C tratado com telmisartana (C-T), dieta rica em gordura (HF), HF tratado com losartana (HF-L), HF tratado com telmisartana (HF-T); C não-tratado telmisartana, *pair-fed* (C-T / PF) e HF não-tratado telmisartana, *pair-fed* (HF-T / PF). $P < 0,05$ quando comparado com o grupo C [a], grupo C-L [b], grupo C-T [c], grupo HF [d], grupo HF-L [e], grupo HF-T [f] e C-T / PF[g]. A barra de escala corresponde a 50 μ m a mesma ampliação para todas as fotomicrográfas (x40).

7.2 Análises pancreáticas – morfometria e estereologia do pâncreas endócrino

O grupo HF apresentou uma massa pancreática maior que o grupo C (+50%, $P < 0,0001$), acompanhada por uma maior área seccional da ilhota (+164%, $P < 0,0001$). Por outro lado, os grupos HF-L e HF-T apresentaram menor massa pancreática (-28% e -33%, $P < 0,0001$, respectivamente) que o grupo HF, mostrando valores semelhantes ao grupo C. Estes

resultados estão em conformidade com a área da seccional reduzida das ilhotas nos grupos HF-L (-48%, $P < 0,0001$) e HF-T (-56%, $P < 0,0001$) em comparação com o grupo HF. Os resultados são demonstrados na tabela 5. Houve uma interação significativa entre dieta e tratamento, bem como uma influência independente da dieta e ambos os tratamentos sobre a massa do pâncreas e área de seccional da ilhota (ANOVA de dois fatores, $P < 0,0001$).

Tabela 5 - Estereologia do pâncreas e citoarquitetura da ilhota

Dados	C	C-L	C-T	HF	HF-L	HF-T	C-T/PF	HF-T/PF
Pâncreas								
Massa (mg)	156±8,7	145±6,1	141±14,0	234±9,1 ^[a]	169±12,0 ^[b,d]	157±13,0 ^[d]	156±15,0	204±5,6 ^[a,d,f,g]
Massa/Tíbia (mg/cm)	78,0±5,2	74,0±5,7	71,0±7,0	119,0±5,4 ^[a]	85,0±5,2 ^[d]	82,0±9,4 ^[d]	81,0±8,4	103,0±4,2 ^[a,d,f,g]
Ilhota								
A [ilhota](10 ³ µm ²)	13,8±2,0	9,8±1,1	11,1±1,7	36,4±5,6 ^[a]	18,9±2,5 ^[b,d]	15,9±3,8 ^[d]	15,4±1,9	33,1±2,8 ^[a,f,g]
M [célula alfa] (mg)	2,0±0,4	1,2±0,1	1,2±0,1	8,1±1,6 ^[a]	2,9±0,1 ^[b,d]	1,4±0,3 ^[d,e]	1,5±0,2	4,7±0,9 ^[a,d,f,g]
M [célula beta] (mg)	3,8±0,7	2,4±0,4	1,6±0,3	28,0±3,6 ^[a]	5,3±0,6 ^[d]	3,4±1,1 ^[d]	3,4±0,5	21,0±2,5 ^[a,d,f,g]
Apoptose								
Caspase-3 (%)	16,0±8,3	12,0±3,8	13±3,6	35,0±4,7 ^[a]	20,0±11,0 ^[b,d]	19,0±8,2 ^[c,d]	18,0±6,9 ^[c]	30,0±5,9 ^[a,f,g]

Legenda: Os dados são apresentados como média ± DP, (n=5). Abreviações: A (área seccional) e M (Massa). Grupos: dieta controle (C), C tratado com losartana (C-L), C tratado com telmisartana (C-T), dieta rica em gordura (HF), HF tratado com losartana (HF-L), HF tratado com telmisartana (HF-T); C não-tratado telmisartana, *pair-fed* (C-T / PF) e HF não-tratado telmisartana, *pair-fed* (HF-T / PF). P <0,05 quando comparado com o grupo C [a], grupo C-L [b], grupo C-T [c], grupo HF [d], grupo HF-L [e], grupo HF-T [f] e C-T / PF[g].

Quanto ao pâncreas endócrino, as massas de células alfa e beta foram maiores no grupo HF que no grupo C (célula alfa, +305% e célula beta, +637%; $P < 0,0001$). Embora as massas de células alfa e beta foram reduzidas no grupo HF-L (-64% e -81%, ambos $P < 0,0001$) e no grupo HF-T (-83% e -88%, ambos $P < 0,0001$) quando comparado ao grupo HF, apenas o grupo HF-T restaurou completamente as massas de célula alfa e de células beta, sendo diferente do grupo HF-L (-51% e -36%, $P < 0,0001$), sugerindo um efeito benéfico adicional do telmisartana. O aumento da intensidade das imunomarcações positivas observada no grupo HF-T para PDX1 (Figura 28) e GPL1 (Figura 27), ajudam a explicar a melhora da glicose de jejum após o tratamento com telmisartana. Ambos os fatores (dieta e tratamento) interagiram para determinar as massas de células alfa e beta, além de influenciar esses parâmetros de forma independente (ANOVA de dois fatores, $P < 0,0001$). No entanto, o tratamento com telmisartana representou 40,24% da variância total da massa célula alfa contra apenas 28,81% de losartana.

A importância dos efeitos pleiotrópicos do telmisartana nas ilhotas pancreáticas é confirmado pelo fato que o grupo HF-T / PF, não tratado, mostrou um aumento significativo em todos os parâmetros, incluindo maior massa pancreática (+30%, $P < 0,0001$) e área seccional da ilhota (+108%, $P < 0,0001$) atrelado ao aumento das massas de célula alfa (+236%, $P < 0,0001$) e células beta (+518%, $P < 0,0001$) quando comparadas ao grupo HF-T. Todos os achados em relação a estrutura da ilhota pancreática são detalhados na tabela 5.

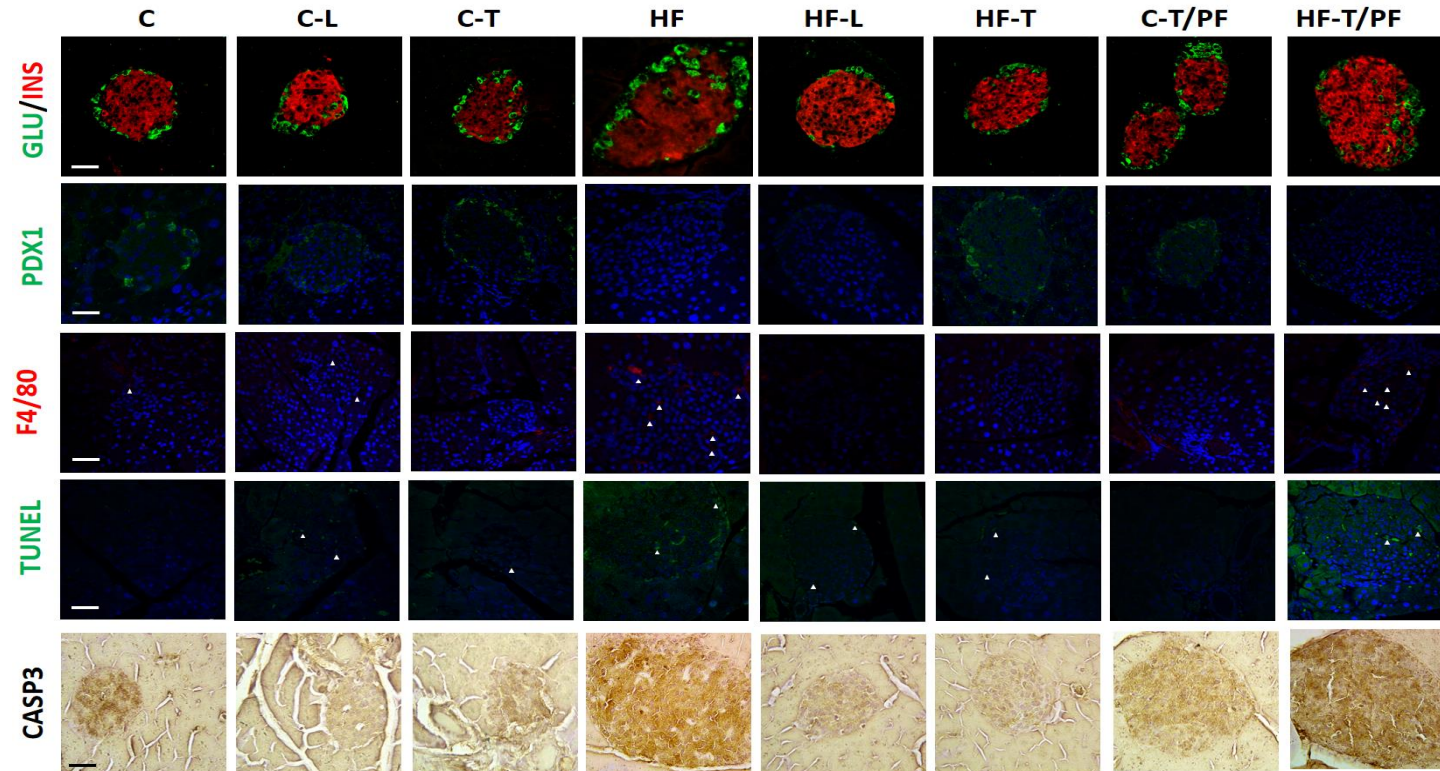
As fotomicrografias da figura 28 ilustram as reações de imunofluorescência positiva para insulina (células beta, em vermelho) e glucagon (células alfa, em verde) nas ilhotas pancreática dos grupos. Ela retrata a hipertrofia das ilhotas, com massas de células alfa e beta aumentada nos animais HF. Inversamente, observamos uma imunomarcção para densidade de glucagon e insulina potencialmente reduzida nos grupos HF-L e HF-T do que no grupo HF, associada às massas de células alfa e beta menores encontradas nos grupos tratados. Mais uma vez, o grupo HF-T / PF, não tratado, mostrou uma distribuição desordenada de células alfa, hipertrofia de ilhotas e maior massa de células beta quando comparado aos animais HF-T (tratado com telmisartana), apresentando semelhança com o grupo HF. Por isso, pode-se argumentar que a ingestão de energia reduzida não é suficiente para produzir recuperação da estrutura das ilhotas pancreáticas.

O bloqueio do AT1R nos grupos tratados provocou uma redução acentuada na infiltração de macrófagos (visualizada através do F4/80+) dentro de ilhotas pancreáticas, o que implica um efeito antiinflamatório sobre os grupos HF-T e HF-L. No grupo HF, foi observado uma infiltração aumentada de macrófagos nas ilhotas quando comparado com o grupo C. Estes resultados estão ilustrados na figura 28.

Em relação à morte celular, observou-se uma maior taxa de apoptose no grupo HF através da imunomarcção positiva do TUNEL e maior densidade de caspase-3 total quando comparado ao grupo C (+119%, $P < 0,0001$). Por outro lado, ambos os tratamentos resultaram em reduzida imunomarcção do TUNEL, assim como da densidade de imunomarcção de caspase-3 total quando comparada ao grupo HF (HF-L, -43%, $P < 0,0001$ e HF-T, -46%, $P < 0,0001$), destacando um efeito positivo na manutenção das ilhotas. Além disso, o grupo HF-T / PF, não tratado, apresentou uma imunomarcção do TUNEL positiva, juntamente com uma imunodensidade de caspase-3 total maior do que o grupo HF-T (+58%, $P < 0,0001$), assegurando os efeitos anti-apoptóticos do telmisartana. Houve interação do tratamento com telmisartana e da dieta para determinar a densidade da caspase-3 (representaram 10% da variância total, ANOVA de dois fatores, $P = 0,0411$); mas a dieta e o tratamento também influenciaram como um estímulo independente (ANOVA de dois fatores, $P < 0,0001$ para dieta e $P = 0,0043$ para tratamento). A fotomicrografia do TUNEL é representado na figura 28, e os resultados da caspase-3 são ilustrados na figura 28 e tabela 5.

Além disso, os efeitos benéficos de ambos os tratamentos na estrutura da ilhota pancreática podem ser, pelo menos em parte, decorrentes de maior vascularização das ilhotas. Desta forma, os grupos HF e HF-T / PF, não tratados, apresentaram expressão reduzida tanto de α -SMA e CD31 como de VEGF quando comparados aos grupos tratados, o que sugere que os grupos tratados podem ter uma vascularização das ilhotas pancreáticas semelhante ao grupo C. Os resultados atuais são mostrados na figura 29.

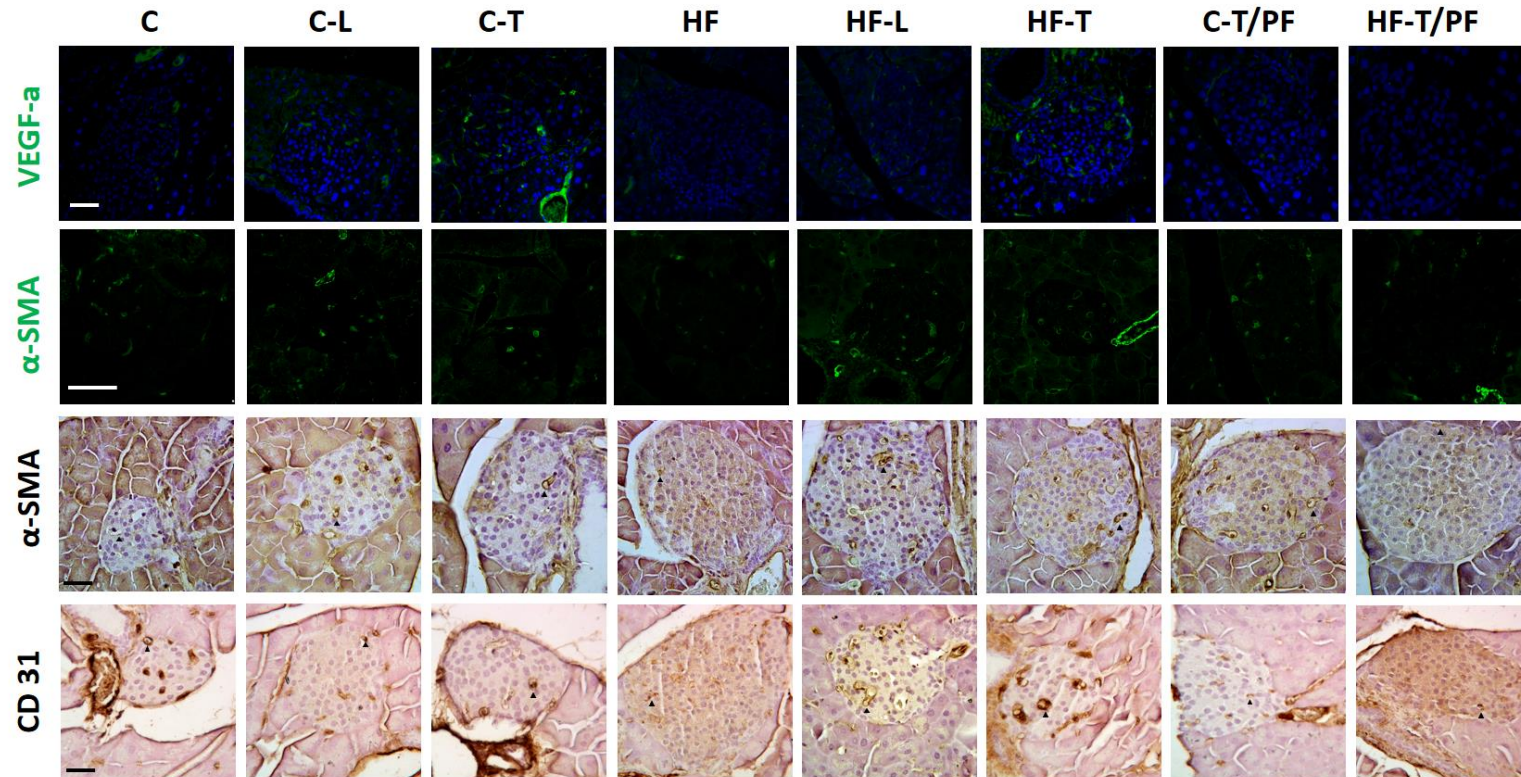
Figura 28 - Imunofluorescência da distribuição das células da ilhotas (glucagon e insulina), expressão de PDX1, infiltração de macrófagos (F4/80), apoptose nas células da ilhota (TUNEL) e imuno-histoquímica da caspase – 3 total.



Legenda: Dupla marcação de insulina (INS, vermelha) e glucagon (GLU, verde) mostrando a distribuição de células alfa/beta. Expressão de fator homeobox pancreático-duodenal1 (PDX1) avaliada por imunofluorescência (verde). Infiltração de macrófagos dentro das ilhotas pancreáticas avaliada por imunofluorescência para F4/80 (vermelho). O ensaio do TUNEL (verde) para detectar células apoptóticas através da fragmentação do DNA. Cabeça de seta indicam o padrão de imunomarcção para F4/80 e TUNEL. Fotomicrografias representativas coradas com caspase-3 total (CASP3, marrom) e contrastadas com hematoxilina. As barras de escala correspondem a 50 μ m, a mesma ampliação para todas as fotomicrográfias (x40). Grupos: dieta controle (C), C tratado com losartana (C-L), C tratado com

telmisartana (C-T), dieta rica em gordura (HF), HF tratado com losartana (HF-L), HF tratado com telmisartana (HF-T); C não-tratado telmisartana, *pair-fed* (C-T / PF) e HF não-tratado telmisartana, *pair-fed* (HF-T / PF).

Figura 29 - Imunofluorescência (VEGF e α -SMA) e imuno-histoquímica (α -SMA e CD31) para vascularização das ilhotas



Legenda: Vascularização da ilhota avaliada por imunofluorescência α -SMA e VEGF (verde). Fotomicrografias representativas das ilhotas coradas com anticorpos CD31 ou α -SMA (marrom) e contrastadas com hematoxilina. As barras de escala correspondem a 50 μ m, a mesma ampliação para todas as imunomarcações (x40), exceto para a imunofluorescência α -SMA (x60). Abreviações: Alfa actina de músculo liso (α -SMA), VEGF (factor de crescimento endotelial vascular A) e *cluster* de

diferenciação 31 (CD31). Grupos: dieta controle (C), C tratado com losartana (C-L), C tratado com telmisartana (C-T), dieta rica em gordura (HF), HF tratado com losartana (HF-L), HF tratado com telmisartana (HF-T); C não-tratado telmisartana, *pair-fed* (C-T / PF) e HF não-tratado telmisartana, *pair-fed* (HF-T / PF).

7.3 *Western blotting* das ilhotas pancreáticas

A expressão de pAKT na ilhota foi menor no grupo HF (-59%, $P < 0,0001$, figura 29A) do que no grupo C. Nos grupos HF tratados, apenas o grupo HF-L apresentou maior expressão de pAKT do que o grupo HF (+103%, $P = 0,0055$, figura 30A), mas o telmisartana mostrou uma tendência para o aumento da expressão da pAKT. Houve apenas uma interação significativa entre a dieta e o tratamento com losartana (representou 59,54% da variância total, ANOVA de dois fatores, $P < 0,0001$), além de uma influência isolada da dieta (ANOVA de dois fatores, $P = 0,0003$) na expressão de pAKT na ilhota.

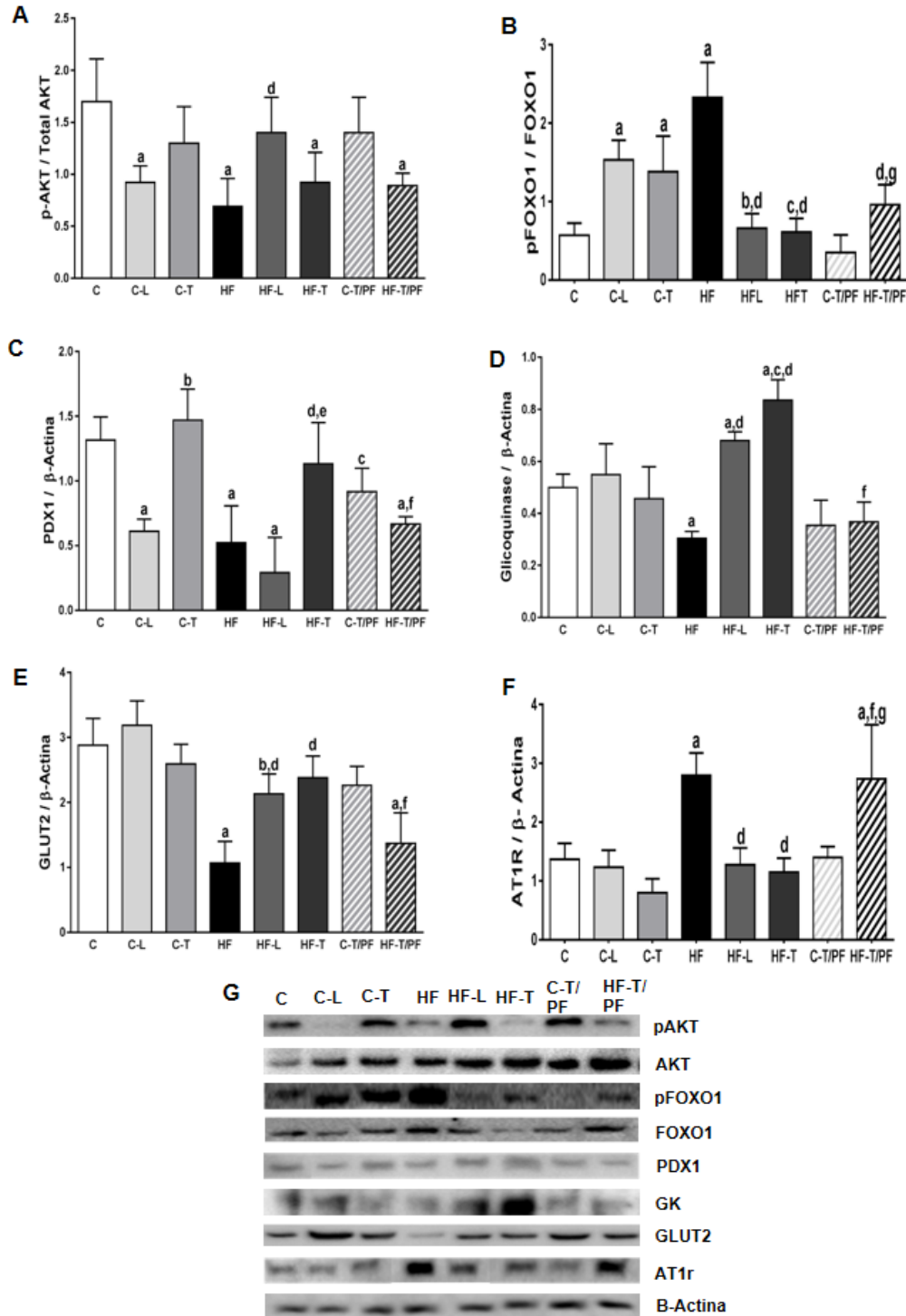
O grupo HF apresentou maior expressão da proteína p-FOXO1 do que o grupo C (+100%, $P < 0,0001$, figura 30B). Mutuamente, tanto HF-L como HF-T apresentaram menor expressão de p-FOXO1 do que o grupo HF (HF-L, -54%, $P < 0,0001$ e HF-T, -61%, $P < 0,0001$, figura 30B). Por outro lado, a expressão de PDX1 foi menor no grupo HF do que no grupo C (-49%, $P = 0,0032$, figura 30C). Contudo, apenas o grupo HF-T mostrou uma restauração completa da expressão de PDX1, não mostrando diferença em relação ao grupo C (figura 30C). A dieta e o tratamento, como estímulo único, exerceram uma influência significativa sobre a expressão de p-FOXO1 (ANOVA de dois fatores, $P = 0,0130$ e $P = 0,0075$). Mais uma vez, houve interação entre dieta e tratamento em relação à expressão da p-FOXO1 na ilhota (ANOVA de dois fatores, $P < 0,0001$). Destaca-se que o tratamento com telmisartana levou a um aumento significativo na expressão de PDX1 na ilhota (ANOVA de dois fatores, $P = 0,0041$), enquanto que o tratamento com losartana resultou em uma baixa expressão de PDX1 na ilhota (ANOVA de dois fatores, $P = 0,0002$). O aumento da expressão do PDX1 após o tratamento com telmisartana também foi encontrado na imunofluorescência, confirmando os achados anteriores (figura 28).

Alvos potenciais das expressões aumentadas de PDX1, GK e GLUT2 foram menores no grupo HF em comparação com o grupo C (-36%, $P = 0,0123$, figura 30D e -62%, $P = 0,0003$, figura 30E). Em contraste, um aumento na expressão GLUT2 foi observado nos grupos HF tratados em comparação com o grupo HF (HF-L, +91%, $P = 0,0432$ e HF-T, +118%, $P = 0,0088$, figura 30E). Da mesma forma, os grupos HF-L e HF-T apresentaram maior expressão de proteína GK do que o grupo HF (HF-L, +106%, $P < 0,0001$ e HF-T, +166%, $P < 0,0001$, figura 30D). É importante ressaltar que a expressão da proteína GK superou mesmo os valores do grupo C no grupo HF-L (+32%, $P = 0,0265$) e no grupo HF-T (+70%, $P < 0,0001$), figura 30D. A dieta e o tratamento, como estímulo isolado, tiveram um

efeito significativo nas expressões de GK (ANOVA de dois fatores, $P = 0,0006$) e GLUT2 (ANOVA de dois fatores, $P < 0,0001$), e interagiram significativamente com o efeito final (ANOVA de dois fatores, $P < 0,0001$ para GK e $P = 0,0003$ para GLUT2).

A taxa de apoptose reduzida nos grupos tratados está ligada à expressão do AT1R reduzido nas ilhotas. Desta forma, os grupos tratados, HF-L e HF-T apresentaram menor expressão do AT1R do que o grupo HF (HF-L, -54%, $P = 0,0325$ e HF-T, -61%, $P = 0,0087$, figura 30F). Por outro lado, o grupo HF apresentou maior expressão de proteína AT1R do que o grupo C (+ 100%, $P = 0,0267$, figura 30F). A ANOVA de dois fatores revelou que o losartana exerceu uma influência independente e interagiu com a dieta para determinar a expressão AT1R, enquanto o telmisartana apenas influenciou esses valores como um estímulo independente.

Figura 30 - Níveis de expressão proteica em ilhotas pancreáticas. Expressão: p-AKT (A), p-FOXO1 (B), PDX1 (C), Glicoquinase (D), GLUT2 (E) e AT1R (F). Blots representativos (G)



Legenda: Os dados são apresentados como média \pm DP, (n=5). Grupos: dieta controle (C), C tratado com losartana (C-L), C tratado com telmisartana (C-T), dieta rica em gordura (HF), HF tratado com losartana (HF-L), HF tratado com telmisartana (HF-T); C não-tratado telmisartana, *pair-fed* (C-T / PF) e HF não-tratado telmisartana, *pair-fed* (HF-T / PF). P < 0,05 quando comparado com o grupo C [a], grupo C-L [b], grupo C-T [c], grupo HF [d], grupo HF-L [e], grupo HF-T [f] e C-T / PF [g]. Abreviações: receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1R), proteína quinase B (AKT), *Forkhead*

box protein O1 (FOXO1), fator homeobox pancreático-duodenal 1 (PDX1), transportador de glicose 2 (GLUT2) e glicocinase (GK).

Em conformidade com os resultados anteriores, o grupo C-T / PF, não tratado, não mostrou diferenças quando comparado ao grupo C em relação à expressão protéica. O mesmo ocorreu no grupo HF-T / PF não tratado quando comparado ao grupo HF, implicando que os efeitos observados nos grupos C-T e HF-T tratados podem ser atribuídos ao telmisartana. Todos os resultados relativos à expressão da proteína na ilhota estão ilustrados na figura 30.

8 DISCUSSÃO DO PÂNCREAS

No presente estudo, comparamos os efeitos benéficos de dois BRAs (losartana e telmisartana) no remodelamento e preservação das ilhotas pancreáticas em um modelo animal de obesidade induzida por dieta. Como esperado, ambos os tratamentos atenuaram a PAS e produziram evidências convincentes para os efeitos pleiotrópicos, incluindo o alívio da intolerância à glicose e a resistência à insulina, além da melhora da distribuição das células das ilhotas e aprimoramento estrutural. No entanto, pode-se argumentar que o tratamento com telmisartana (HF-T) desencadeou benefícios adicionais através de perda da MC e metabolismo de glicose aumentado com menos massa de células alfa após 15 semanas de dieta HF.

A administração de telmisartana reduziu a ingestão de energia e impediu o ganho de MC, mesmo mantendo a dieta HF, o que foi atribuído anteriormente à ativação de caminhos lipolíticos dependentes de PPAR-beta/delta em camundongos alimentados com dieta HF (He, Yang et al. 2010). Recentemente, foi proposto um papel para o sistema renina-angiotensina no cérebro na redução da ingestão de energia e no aumento do gasto energético após o tratamento com telmisartana em camundongos alimentados com dieta de cafeteria. Assim, pode-se argumentar que a telmisartana reduz MC através de um mecanismo orientado pelo sistema nervoso central (Winkler, Schuchard et al. 2016). De fato, os dados atuais mostram evidências convincentes de que a MC reduzida é um efeito direto do fármaco, dado que o grupo HF-T/PF, não tratado, apresentou sobrepeso como o grupo HF.

A resistência à insulina é geralmente acompanhada do aumento da MC, o que requer um ajuste proporcional da secreção de insulina pelas células beta pancreáticas para preservar a homeostase da glicose (Muller-Fielitz, Hubel et al. 2014). Nossos dados revelaram apenas no grupo HF-T a redução da glicemia de jejum, o que foi previamente mostrado em camundongos db/db (um modelo genético para avaliar o déficit da atividade do receptor de leptina), tratado com telmisartana (Muller-Fielitz, Landolt et al. 2012). No entanto, ambos os tratamentos são indicativos da melhora da função das ilhotas pancreáticas, na medida em que respondem adequadamente à hiperinsulinemia e à intolerância à glicose, como descrito anteriormente para o tratamento com telmisartana em roedores (Souza-Mello, Gregorio et al. 2010, Muller-Fielitz, Hubel et al. 2014). No que diz respeito à abordagem da intolerância à glicose, ambos os tratamentos apresentaram efeitos semelhantes. Pode-se argumentar que a

melhora da sensibilidade à insulina após o bloqueio AT1R crônico não depende dos efeitos relacionados ao PPAR-gama (Muller-Fielitz, Landolt et al. 2012).

Um estudo clínico recente, abordando obesidade abdominal em adultos tratados com telmisartana, revelou uma melhora significativa na função das células beta, conforme determinado pelo índice insulinogênico (Chetty, Damjanovic et al. 2014). Por outro lado, estudos experimentais mostraram que camundongos tratados com telmisartana apresentaram restauração da citoarquitetura das ilhotas, distribuição preservada de células alfa e beta e redução da esteatose pancreática (Souza-Mello, Gregorio et al. 2010, Zhao, Chan et al. 2015). Em camundongos jovens diabéticos tipo 2, o tratamento oral com losartana atrasou o início do diabetes, diminuiu a hiperglicemia, melhorou a função das células beta e a tolerância à glicose (Chu, Lau et al. 2006). No presente estudo, observamos redução na massa pancreática, da densidade do volume das ilhotas, das massas de células alfa e beta, todas associadas ao remodelamento estrutural benéfico das ilhotas em ambos os grupos tratados. No entanto, os camundongos HF tratados com telmisartana atingiram níveis reduzidos de glicemia em jejum com uma massa de células alfa menor do que os camundongos HF tratados com losartana. Os níveis elevados de GLP-1 parecem mediar esses achados, uma vez que a combinação de telmisartana com inibidores de dipeptidil peptidase tipo 4, como a sitagliptina e a linagliptina, mostrou efeitos benéficos aditivos sobre o remodelamento ultraestrutural do pâncreas e a proliferação de ilhotas em camundongos (Souza-Mello, Gregorio et al. 2011, Zhao, Chan et al. 2015).

A obesidade induzida por dieta em camundongos causa expansão da massa celular das ilhotas pancreáticas (Souza-Mello, Gregorio et al. 2011) e aumento da infiltração de macrófagos nessas ilhotas, seguida da resposta inflamatória sistêmica, com altos níveis de IL-1 beta, IL-6 e TNF-alfa (Cucak, Grunnet et al. 2014, Meier, Morcos et al. 2014). A maior infiltração de macrófagos F4/80+ foi encontrada nas ilhotas do grupo HF, que é comum na obesidade, e correlaciona-se com o aumento dos níveis de glicemia devido à diminuição da produção de insulina nas células beta (Cucak, Grunnet et al. 2014).

A alteração da sinalização da proteína AKT nas células beta pode causar disfunções relacionadas à secreção de insulina como as observadas no DM2. Estudos mostram que a redução da fosforilação da proteína AKT resulta em intolerância à glicose devido ao papel fundamental da AKT na regulação da secreção de insulina e na função das células beta (Bernal-Mizrachi, Fatrai et al. 2004, Borges, Salles et al. 2016) A dieta HF reduziu a expressão da proteína pAKT / AKT nas ilhotas pancreáticas, como demonstrado no presente estudo, o que foi completamente restaurada pelo tratamento com o losartana. Esta restauração

da expressão da proteína pAKT / AKT na ilhota implica na detecção de glicose adequada por células beta, que está diretamente relacionada à expressão melhorada de GLUT2. Além disso, isto sugere que a atividade da glicoquinase seja melhorada na presença de níveis aumentados da proteína GLUT2 através do acoplamento protéico-protéico uma vez que a glicoquinase é responsável pela fosforilação da glicose durante a glicólise e é uma enzima limitante quando se trata de secreção de insulina estimulada pela glicose (Ferber, BeltrandelRio et al. 1994, Kooptiwut, Zraika et al. 2002).

Um efeito significativo da proteína AKT é sua capacidade de fosforilar a proteína FOXO1, a qual, por sua vez, inativa sua atividade transcricional causando *down-regulation*. A proteína FOXO1 é essencial para crescimento e função de células beta (Kitamura 2013). Estudos têm mostrado níveis aumentados do gene FOXO1 nas ilhotas de pacientes com diabetes tipo 2 e em camundongos alimentados com dieta HF, cumprindo um estado de resistência à insulina (Del Guerra, Lupi et al. 2005, Borges, Salles et al. 2016). Os dados atuais mostraram aumento da expressão de p-FOXO1 nas ilhotas do grupo HF, enquanto que ambos os grupos HF tratados mostraram uma diminuição da expressão de p-FOXO1 nas ilhotas pancreáticas. É importante destacar que, embora a telmisartana não tenha produzido um aumento significativo na expressão de AKT, conseguiu reduzir a expressão de p-FOXO1 provavelmente por uma forte interação entre as vias FOXO1 e PPAR-gama (Gupta, Leahy et al. 2013).

Nas células beta, a FOXO1 inibe a proliferação celular através da supressão de PDX1 (Kitamura 2013). PDX1 é um fator de transcrição expresso no pâncreas endócrino e no duodeno, que é essencial para o desenvolvimento adequado tanto do pâncreas endócrino quanto exócrino, além de ter um papel decisivo na manutenção da célula beta madura (Li, Cao et al. 2005). A expressão de PDX1 reduzida ocorre em modelos *in vitro* de glucotoxicidade e acompanha o desenvolvimento de diabetes em modelos experimentais genéticos, correlacionando baixos níveis de PDX1 com prejuízo das células beta (Sachdeva, Claiborn et al. 2009). Nossos dados mostraram que o grupo HF tinha uma via AKT-FOXO1 interrompida, juntamente com uma expressão de PDX1 reduzida, exercendo uma desordem completa na arquitetura de ilhotas pancreáticas e intolerância à glicose.

Em contraste, a expressão de PDX1 preservada é preditiva de um controle glucorregulador melhor e função de incretina preservada. O tratamento com GLP-1 das ilhotas pancreáticas ou de roedores induz a expressão do gene PDX1, e ambos compartilham alguns alvos de transcrição importantes, como GLUT2 e glicoquinase (Li, Cao et al. 2005, Huang, Yuan et al. 2015). Além disso, a expressão de PDX1 na ilhota é essencial para os

efeitos fisiológicos do GLP-1 (Li, Cao et al. 2005). Assim, o aumento da expressão do PDX1 na ilhota do grupo HF-T quando comparado ao grupo HF-L e HF pode indicar uma possível interação entre PPAR-gama e incretina, apontando para o papel protetor do telmisartana contra a inflamação e lipotoxicidade através da indução de PDX1 (Li, Cao et al. 2005). O PDX1 parece ser capaz de atuar como mediador a jusante da ação da incretina, uma vez que o grupo HF-T também mostrou um aumento significativo nos níveis de GLP-1 e na expressão intra-ilhota.

Como indicado anteriormente, os alvos do PDX1 incluem genes envolvidos no metabolismo da glicose como GLUT2 e GK (Chenghu Huang 2014), marcadores significativos da função das células beta. No que diz respeito a GK, é um importante sensor de glicose e desempenha um papel fundamental na GSIS, exercendo um grande impacto sobre a homeostase da glicose. Portanto, a expressão aumentada de GK correlaciona-se com a glicemia baixa (Lenzen 2014, Nakamura and Terauchi 2015). Aqui, mostramos super expressão de GK em ambos os grupos HF tratados, juntamente com níveis normais de insulina. Pode-se argumentar que a ativação de GK causaria a exaustão das células beta em longo prazo se a secreção de insulina melhorada não fosse seguida por melhora da biossíntese de insulina. Contudo, foi recentemente demonstrado que o uso de ativadores de GK produziu GSIS adequada sem qualquer preocupação com a vida útil das ilhotas (Gill, Brocklehurst et al. 2011).

Na célula beta de camundongo, o GLUT2 é necessário para a GSIS adequada, além de atuar como o principal transportador de glicose. Na ausência de GLUT2, a glicose não atinge a célula e há alta estimulação da secreção de glucagon (Folli, Okada et al. 2011). Como resultado, a expressão baixa de GLUT2 encontrada em camundongos HF não tratados foi acompanhada por um aumento da massa de célula alfa, confirmando esta hipótese. A expressão reduzida de GLUT2 está ligada à hipersecreção e hipertrofia compensatórias das ilhotas, indicando um distúrbio na função das células beta e na síntese de insulina (Thorens 2015). Em contraste, salienta-se que o grupo HF-T conseguiu alcançar uma redução da glicemia em jejum e combater a intolerância à glicose com menos massa de célula alfa que o grupo HF-L. Isso pode ser explicado pela expressão aprimorada tanto do GLUT2 como da GK após o tratamento com telmisartana, juntamente com maiores concentrações de GLP-1, o que estimula a secreção de insulina nas células beta via PDX1 e inibe a secreção de glucagon (Baggio and Drucker 2007).

Além disso, a baixa expressão de GLUT2 e PDX1 está associada ao aumento da apoptose, especialmente em um estado hiperglicêmico (Johnson, Ahmed et al. 2003, Bonora

2008). A ativação da caspase-3 está relacionada aos passos finais da apoptose celular (Zhang, Ren et al. 2014), e tanto a telmisartana quanto a losartana causaram uma marcação reduzida da expressão intracelular da caspase-3 total dentro das ilhotas pancreáticas. Essas observações concordam com as imunorreacções positivas do TUNEL aprimoradas nos grupos HF e HF-T / PF, juntamente com imunorreacções reduzidas ou mesmo ausentes do TUNEL nos grupos HF-L e HF-T, indicando efeitos anti-apoptóticos e, portanto, preservação das ilhotas. Os BRAs suprimem o AT1R de forma seletiva, atenuando os efeitos deletérios da ANG II, tais como a vasoconstrição, inflamação e a apoptose das células beta, que contribuem para a preservação da massa de célula beta e GSIS adequada (Olivares-Reyes, Arellano-Plancarte et al. 2009). Na tentativa de verificar se a alta taxa de apoptose correlacionou-se com a ativação de células estreladas pancreáticas no grupo HF, a alfa-SMA foi abordada (Masamune, Watanabe et al. 2009). Apesar de não mostrar nenhuma célula estrelada pancreática ativada, o grupo HF mostrou uma imunomarcção de alfa-SMA fraca intrigante, enquanto que os grupos HF tratados apresentaram marcação de alfa-SMA intra-ilhota positiva. Então, hipotetizamos que esse resultado pudesse indicar uma melhor vascularização da ilhota.

Considerando que a administração exógena de ANG II inibe a liberação de insulina e está associada à diminuição do fluxo sanguíneo nas ilhotas e da biossíntese de (pro) insulina (Chu, Lau et al. 2006), o tratamento com BRAs pode aliviar esses achados. De acordo com isso, os animais tratados com losartana e telmisartana exibiram imunomarcção positiva para CD31 intra-ilhota. O CD31 é um marcador endotelial, adequado para a avaliação da vascularização de ilhotas, sugerindo uma maior perfusão nas ilhotas após os tratamentos propostos (Duvillie, Currie et al. 2002). Em contraste, o grupo HF apresentou uma marcação fraca de CD31 juntamente com a diminuição da expressão intra-ilhota de VEGF. O último indica uma vascularização reduzida das ilhotas e células endoteliais intra-ilhota, causando comprometimento da distribuição de insulina para a circulação sistêmica. Vale ressaltar que a restauração da expressão de VEGF pelos BRAs é um achado importante para a adequação da secreção de insulina e redução da intolerância à glicose (Reinert, Brissova et al. 2013).

As alterações compensatórias na vascularização da ilhota, exibidas pelos grupos HF-L e HF-T, podem influenciar na homeostase da glicose em ilhotas pancreáticas e prevenir o aparecimento do diabetes. Atualmente, a angiogênese está associada ao início da vida ou à presença de células tumorais. Conforme sugerido anteriormente, a vascularização das ilhotas adapta-se através da dilatação e não da angiogênese. Portanto, apresentamos que os efeitos observados devido a ambos os tratamentos podem estar relacionados à vasodilatação e ao fluxo sanguíneo das ilhotas melhorado (Dai, Brissova et al. 2013).

Os benefícios de ambos os tratamentos incluem o alívio da intolerância à glicose, a normalização dos níveis de insulina, a baixa expressão de p-FOXO1 acoplado com alta expressão na ilhota de GLUT2 e GK, e com fluxo sanguíneo de ilhotas aumentado. Este último pode ser explicado pelo bloqueio AT1R. A melhora da fosforilação de AKT parece mediar resultados benéficos estruturais e moleculares em ilhotas de animais tratados com losartana. Por outro lado, acreditamos que a ativação parcial de PPAR-gama pelo telmisartana causa um efeito protetor adicional na estrutura e função das ilhotas pancreáticas quando comparado ao losartana. Estes incluem a restauração da massa corporal, sem influência da ingestão de energia, juntamente com a normalização da glicemia. Pode-se argumentar que a expressão aumentada de PDX1 na ilhota sustenta esses achados e pode envolver uma interação entre a ativação parcial de PPAR-gama e indução de GLP-1, que deve ser investigada *in vitro*.

CONCLUSÕES

a) Conclusão do tecido adiposo branco subcutâneo

Nossos resultados mostram evidências convincentes de que o tratamento com losartana proporcionou uma redução da MC induzida pela dieta hiperlipídica em camundongos com aumento do gasto energético (EE) através da indução de células de gordura termogênicas, os adipócitos bege. Em outras palavras, a energia excedente foi dissipada como calor em vez de ser armazenada como gordura. A MC reduzida, o aumento da sensibilidade à insulina, a diminuição do tamanho dos adipócitos e a marcada expressão de UCP1 nos adipócitos multiloculares apóiam esses achados. A modulação de PPARs por um novo perfil de adipocina após o tratamento com losartana parece mediar a aquisição de características do TAM por adipócitos brancos, pois esses fatores de transcrição direcionam os genes envolvidos na indução do fenômeno *browning*, via sinalização termogênica e manutenção de fenótipos de adipócitos bege. Apesar de mais estudos serem necessários para oferecer melhores percepções sobre o mecanismo, nossos resultados apontam para um provável uso do losartana como um medicamento coadjuvante para tratar a obesidade e seus distúrbios relacionados.

b) Conclusão do pâncreas

Nossos resultados asseguram que a estrutura e o funcionamento da ilhota pancreática se beneficiam de ambos os tratamentos, pois a losartana e telmisartana promoveram alívio da hiperinsulinemia e adequada detecção e absorção de glicose pelas ilhotas pancreáticas. Além disso, tanto a apoptose diminuída quanto o fluxo sanguíneo de ilhotas aumentado nos camundongos HF tratadas mediaram esses efeitos. Efeitos adicionais do telmisartana podem ser originados da diminuição da massa corporal. Notavelmente, os animais HF-T exibiram menor massa de células alfa que o grupo HF-L e uma restauração completa da massa de células beta, o que implica na maior ação de insulina e menor demanda de glucagon para alcançar a glicemia normal. Os níveis elevados de GLP-1, juntamente com altas expressões de

PDX1, GK e GLUT2 nas ilhotas, podem mediar esses achados, levando a um melhor acoplamento entre a detecção de glicose e a secreção de insulina. Em conclusão, BRAs causaram melhora da estrutura e função da ilhota, que estão de acordo com a preservação de ilhotas no presente modelo experimental. Estes resultados são translacionais no que se refere a estratégias farmacológicas para a prevenção do diagnóstico de diabetes na população mundial.

REFERÊNCIAS

- Ahima, R. S. (2014). "Editorial: molecular obesity research: lessons learned?" Mol Endocrinol **28**(6): 785-789.
- Ahren, B. (2009). "Beta- and alpha-cell dysfunction in subjects developing impaired glucose tolerance: outcome of a 12-year prospective study in postmenopausal Caucasian women." Diabetes **58**(3): 726-731.
- Ahren, B. and G. Pacini (2005). "Islet adaptation to insulin resistance: mechanisms and implications for intervention." Diabetes Obes Metab **7**(1): 2-8.
- Alberti, K. G., P. Zimmet and J. Shaw (2006). "Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation." Diabet Med **23**(5): 469-480.
- An, J., T. Nakajima, K. Kuba and A. Kimura (2010). "Losartan inhibits LPS-induced inflammatory signaling through a PPARgamma-dependent mechanism in human THP-1 macrophages." Hypertens Res **33**(8): 831-835.
- Araki, K., T. Masaki, I. Katsuragi, K. Tanaka, T. Kakuma and H. Yoshimatsu (2006). "Telmisartan prevents obesity and increases the expression of uncoupling protein 1 in diet-induced obese mice." Hypertension **48**(1): 51-57.
- Arch, J. R. and P. Trayhurn (2013). "Detection of thermogenesis in rodents in response to anti-obesity drugs and genetic modification." Front Physiol **4**: 64.
- Atlas, S. A. (2007). "The Renin-Angiotensin Aldosterone System: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition." J Manag Care Pharm **13**((8 Supp B)).
- Avruch (1998). "Insulin signal transduction through protein kinase cascades." Molecular and cellular biochemistry **182**: 31-48.
- Bader M, G. D. (2008). "Update on tissue renin-angiotensin systems." J Mol Med (Berl).
- Baggio, L. L. and D. J. Drucker (2007). "Biology of incretins: GLP-1 and GIP." Gastroenterology **132**(6): 2131-2157.
- Barbosa-da-Silva, S., J. C. Fraulob-Aquino, J. R. Lopes, C. A. Mandarim-de-Lacerda and M. B. Aguilá (2012). "Weight cycling enhances adipose tissue inflammatory responses in male mice." PLoS One **7**(7): e39837.
- Bargut, T. C., V. Souza-Mello, C. A. Mandarim-de-Lacerda and M. B. Aguilá (2016). "Fish oil diet modulates epididymal and inguinal adipocyte metabolism in mice." Food Funct **7**(3): 1468-1476.
- Bartelt, A. and J. Heeren (2014). "Adipose tissue browning and metabolic health." Nat Rev Endocrinol **10**(1): 24-36.

Benson, S. C., H. A. Pershadsingh, C. I. Ho, A. Chittiboyina, P. Desai, M. Pravenec, N. Qi, J. Wang, M. A. Avery and T. W. Kurtz (2004). "Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPARgamma-modulating activity." Hypertension **43**(5): 993-1002.

Berg, A. H., T. P. Combs and P. E. Scherer (2002). "ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism." Trends Endocrinol Metab **13**(2): 84-89.

Bernal-Mizrachi, E., S. Fatrai, J. D. Johnson, M. Ohsugi, K. Otani, Z. Han, K. S. Polonsky and M. A. Permutt (2004). "Defective insulin secretion and increased susceptibility to experimental diabetes are induced by reduced Akt activity in pancreatic islet beta cells." J Clin Invest **114**(7): 928-936.

Bhatia, V. and P. Viswanathan (2006). "Insulin resistance and PPAR insulin sensitizers." Curr Opin Investig Drugs **7**(10): 891-897.

Bonora, E. (2008). "Protection of pancreatic beta-cells: is it feasible?" Nutr Metab Cardiovasc Dis **18**(1): 74-83.

Borges, C. (2015). Efeitos adversos da deficiência de vitamina D em ilhotas pancreáticas de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Borges, C. C., A. F. Salles, I. Bringhenti, V. Souza-Mello, C. A. Mandarim-de-Lacerda and M. B. Aguila (2016). "Adverse effects of vitamin D deficiency on the Pi3k/Akt pathway and pancreatic islet morphology in diet-induced obese mice." Mol Nutr Food Res **60**(2): 346-357.

Bostrom, P., J. Wu, M. P. Jedrychowski, A. Korde, L. Ye, J. C. Lo, K. A. Rasbach, E. A. Bostrom, J. H. Choi, J. Z. Long, S. Kajimura, M. C. Zingaretti, B. F. Vind, H. Tu, S. Cinti, K. Hojlund, S. P. Gygi and B. M. Spiegelman (2012). "A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis." Nature **481**(7382): 463-468.

Brito, F. N. B. e. M. d. N. (2012). "TECIDO ADIPOSITO MARROM E OBESIDADE EM HUMANOS." Revista saúde e pesquisa **5**: 121-135.

Brunet, A., A. Bonni, M. J. Zigmond, M. Z. Lin, P. Juo, L. S. Hu, M. J. Anderson, K. C. Arden, J. Blenis and M. E. Greenberg (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." Cell **96**(6): 857-868.

Bugianesi, E., A. J. McCullough and G. Marchesini (2005). "Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease." Hepatology **42**(5): 987-1000.

Bustin, S. A., V. Benes, J. A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M. W. Pfaffl, G. L. Shipley, J. Vandesompele and C. T. Wittwer (2009). "The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments." Clin Chem **55**(4): 611-622.

Buteau, J. (2008). "GLP-1 receptor signaling: effects on pancreatic beta-cell proliferation and survival." Diabetes Metab **34 Suppl 2**: S73-77.

Cannon, B. and J. Nedergaard (2004). "Brown adipose tissue: function and physiological significance." Physiol Rev **84**(1): 277-359.

Cannon, B. and J. Nedergaard (2010). "Metabolic consequences of the presence or absence of the thermogenic capacity of brown adipose tissue in mice (and probably in humans)." Int J Obes (Lond) **34 Suppl 1**: S7-16.

Cantiello, F., A. Cicione, A. Salonia, R. Autorino, C. De Nunzio, A. Briganti, G. Gandaglia, P. Dell'Oglio, P. Capogrosso and R. Damiano (2015). "Association between metabolic syndrome, obesity, diabetes mellitus and oncological outcomes of bladder cancer: a systematic review." Int J Urol **22**(1): 22-32.

Cedikova, M., M. Kripnerova, J. Dvorakova, P. Pitule, M. Grundmanova, V. Babuska, D. Mullerova and J. Kuncova (2016). "Mitochondria in White, Brown, and Beige Adipocytes." Stem Cells Int **2016**: 6067349.

Cerf, M. E. (2007). "High fat diet modulation of glucose sensing in the beta-cell." Med Sci Monit **13**(1): RA12-17.

Chen, D., M. Zhao and G. R. Mundy (2004). "Bone morphogenetic proteins." Growth Factors **22**(4): 233-241.

Chenghu Huang, L. Y. a. S. C. (2014). "Involvement of telmisartan on the protective effects mediated by the peroxisome proliferator-activated receptor- γ pathway in mice." Int J Diabetes Clin Res.

Chetty, V. T., S. Damjanovic, H. Gerstein, N. Singh, S. Yusuf, S. S. Anand and A. M. Sharma (2014). "Metabolic effects of telmisartan in subjects with abdominal obesity: a prospective randomized controlled trial." Blood Press **23**(1): 54-60.

Chu, K. Y., T. Lau, P. O. Carlsson and P. S. Leung (2006). "Angiotensin II type 1 receptor blockade improves beta-cell function and glucose tolerance in a mouse model of type 2 diabetes." Diabetes **55**(2): 367-374.

Cohen, G., O. Shamni, Y. Avrahami, O. Cohen, E. C. Broner, N. Filippov-Levy, C. Chatgialloglu, C. Ferreri, N. Kaiser and S. Sasson (2015). "Beta cell response to nutrient overload involves phospholipid remodelling and lipid peroxidation." Diabetologia.

Cohen, P., J. D. Levy, Y. Zhang, A. Frontini, D. P. Kolodin, K. J. Svensson, J. C. Lo, X. Zeng, L. Ye, M. J. Khandekar, J. Wu, S. C. Gunawardana, A. S. Banks, J. P. Camporez, M. J. Jurczak, S. Kajimura, D. W. Piston, D. Mathis, S. Cinti, G. I. Shulman, P. Seale and B. M. Spiegelman (2014). "Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch." Cell **156**(1-2): 304-316.

Cousin, B., S. Cinti, M. Morrioni, S. Raimbault, D. Ricquier, L. Penicaud and L. Casteilla (1992). "Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization." J Cell Sci **103 (Pt 4)**: 931-942.

Crowley, V. and A. J. Vidal-Puig (2001). "Mitochondrial uncoupling proteins (UCPs) and obesity." Nutr Metab Cardiovasc Dis **11**(1): 70-75.

- Crujeiras, A. B., M. Pardo and F. F. Casanueva (2015). "Irisin: 'fat' or artefact." Clin Endocrinol (Oxf) **82**(4): 467-474.
- Cruz-Orive, L. M. and E. R. Weibel (1990). "Recent stereological methods for cell biology: a brief survey." Am J Physiol **258**(4 Pt 1): L148-156.
- Cucak, H., L. G. Grunnet and A. Rosendahl (2014). "Accumulation of M1-like macrophages in type 2 diabetic islets is followed by a systemic shift in macrophage polarization." J Leukoc Biol **95**(1): 149-160.
- Cypess, A. M., L. S. Weiner, C. Roberts-Toler, E. Franquet Elia, S. H. Kessler, P. A. Kahn, J. English, K. Chatman, S. A. Trauger, A. Doria and G. M. Kolodny (2015). "Activation of human brown adipose tissue by a beta3-adrenergic receptor agonist." Cell Metab **21**(1): 33-38.
- Dai, C., M. Brissova, R. B. Reinert, L. Nyman, E. H. Liu, C. Thompson, A. Shostak, M. Shiota, T. Takahashi and A. C. Powers (2013). "Pancreatic islet vasculature adapts to insulin resistance through dilation and not angiogenesis." Diabetes **62**(12): 4144-4153.
- de Kloet, A. D., E. G. Krause and S. C. Woods (2010). "The renin angiotensin system and the metabolic syndrome." Physiol Behav **100**(5): 525-534.
- de Oliveira, R., T. I. Moraes, A. Cerda, M. H. Hirata, C. M. Fajardo, M. C. Sousa, E. L. Dorea, M. M. Bernik and R. D. Hirata (2015). "ADIPOQ and IL6 variants are associated with a pro-inflammatory status in obesese with cardiometabolic dysfunction." Diabetol Metab Syndr **7**: 34.
- DeFronzo, R. A. and M. A. Abdul-Ghani (2011). "Preservation of beta-cell function: the key to diabetes prevention." J Clin Endocrinol Metab **96**(8): 2354-2366.
- DeFronzo, R. A. and E. Ferrannini (1987). "Regulation of hepatic glucose metabolism in humans." Diabetes Metab Rev **3**(2): 415-459.
- Del Guerra, S., R. Lupi, L. Marselli, M. Masini, M. Bugliani, S. Sbrana, S. Torri, M. Pollera, U. Boggi, F. Mosca, S. Del Prato and P. Marchetti (2005). "Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes." Diabetes **54**(3): 727-735.
- Deng, F. E., N. Shivappa, Y. Tang, J. R. Mann and J. R. Hebert (2017). "Association between diet-related inflammation, all-cause, all-cancer, and cardiovascular disease mortality, with special focus on prediabetics: findings from NHANES III." Eur J Nutr **56**(3): 1085-1093.
- Dickson, L. M. and C. J. Rhodes (2004). "Pancreatic beta-cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase B in the Akt?" Am J Physiol Endocrinol Metab **287**(2): E192-198.
- Divoux, A. and K. Clement (2011). "Architecture and the extracellular matrix: the still unappreciated components of the adipose tissue." Obes Rev **12**(5): e494-503.
- Dunham-Snary, K. J. and S. W. Ballinger (2013). "Mitochondrial genetics and obesity: evolutionary adaptation and contemporary disease susceptibility." Free Radic Biol Med **65**: 1229-1237.

Duvillie, B., C. Currie, T. Chrones, D. Bucchini, J. Jami, R. L. Joshi and D. J. Hill (2002). "Increased islet cell proliferation, decreased apoptosis, and greater vascularization leading to beta-cell hyperplasia in mutant mice lacking insulin." *Endocrinology* **143**(4): 1530-1537.

Dzau, V. and R. Pratt (1986). "Renin-angiotensin system: biology, physiology and pharmacology." *Handbook of experimental cardiology*.: 1631-1661.

Eliete Dalla Corte Frantz, V. d. Souza-Mello and a. C. A. Mandarim-de-Lacerda* (2015). PÂNCREAS: ANATOMY, DISEASES AND HEALTH IMPLICATIONS.

Enerback, S. (2009). "The origins of brown adipose tissue." *N Engl J Med* **360**(19): 2021-2023.

Expert Panel on Detection, E. and A. Treatment of High Blood Cholesterol in (2001). "Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III)." *JAMA* **285**(19): 2486-2497.

Ferber, S., H. BeltrandelRio, J. H. Johnson, R. J. Noel, L. E. Cassidy, S. Clark, T. C. Becker, S. D. Hughes and C. B. Newgard (1994). "GLUT-2 gene transfer into insulinoma cells confers both low and high affinity glucose-stimulated insulin release. Relationship to glucokinase activity." *J Biol Chem* **269**(15): 11523-11529.

Fernandes-Santos, C., R. E. Carneiro, L. de Souza Mendonca, M. B. Aguila and C. A. Mandarim-de-Lacerda (2009). "Pan-PPAR agonist beneficial effects in overweight mice fed a high-fat high-sucrose diet." *Nutrition* **25**(7-8): 818-827.

Ferrannini, E., E. Muscelli, A. Natali, R. Gabriel, A. Mitrakou, A. Flyvbjerg, A. Golay and K. Hojlund (2007). "Association of fasting glucagon and proinsulin concentrations with insulin resistance." *Diabetologia* **50**(11): 2342-2347.

Folli, F., T. Okada, C. Perego, J. Gunton, C. W. Liew, M. Akiyama, A. D'Amico, S. La Rosa, C. Placidi, R. Lupi, P. Marchetti, G. Sesti, M. Hellerstein, L. Perego and R. N. Kulkarni (2011). "Altered insulin receptor signalling and beta-cell cycle dynamics in type 2 diabetes mellitus." *PLoS One* **6**(11): e28050.

Frantz, E. D., C. Crespo-Mascarenhas, A. R. Barreto-Vianna, M. B. Aguila and C. A. Mandarim-de-Lacerda (2013). "Renin-angiotensin system blockers protect pancreatic islets against diet-induced obesity and insulin resistance in mice." *PLoS One* **8**(7): e67192.

Fraulob, J. C., R. Ogg-Diamantino, C. Fernandes-Santos, M. B. Aguila and C. A. Mandarim-de-Lacerda (2010). "A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pâncreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet." *J Clin Biochem Nutr* **46**(3): 212-223.

Fujisaka, S., I. Usui, A. Bukhari, M. Icutani, T. Oya, Y. Kanatani, K. Tsuneyama, Y. Nagai, K. Takatsu, M. Urakaze, M. Kobayashi and K. Tobe (2009). "Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice." *Diabetes* **58**(11): 2574-2582.

Garvey, W. T. (2013). "New tools for weight-loss therapy enable a more robust medical model for obesity treatment: rationale for a complications-centric approach." Endocr Pract **19**(5): 864-874.

Gill, D., K. J. Brocklehurst, H. W. Brown and D. M. Smith (2011). "Upregulation of beta-cell genes and improved function in rodent islets following chronic glucokinase activation." J Mol Endocrinol **47**(1): 59-67.

Giralt, M. and F. Villarroya (2013). "White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions?" Endocrinology **154**(9): 2992-3000.

Goodman LS, G. A., Brunton LL, Chabner BA, Knollman BC. Goodman & Gilman (2012). As Bases Farmacológicas da Terapêutica.

Goossens, G. H. (2008). "The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance." Physiol Behav **94**(2): 206-218.

Graus-Nunes, F., E. Dalla Corte Frantz, W. R. Lannes, M. C. da Silva Menezes, C. A. Mandarim-de-Lacerda and V. Souza-Mello (2015). "Pregestational maternal obesity impairs endocrine pancreas in male F1 and F2 progeny." Nutrition **31**(2): 380-387.

Grundey, S. M. (2016). "Metabolic syndrome update." Trends Cardiovasc Med **26**(4): 364-373.

Grundey, S. M., H. B. Brewer, Jr., J. I. Cleeman, S. C. Smith, Jr., C. Lenfant, L. National Heart, I. Blood and A. American Heart (2004). "Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(2): e13-18.

Gupta, D., A. A. Leahy, N. Monga, M. Peshavaria, T. L. Jetton and J. L. Leahy (2013). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and its target genes are downstream effectors of FoxO1 protein in islet beta-cells: mechanism of beta-cell compensation and failure." J Biol Chem **288**(35): 25440-25449.

Gustafson, B. and U. Smith (2015). "Regulation of white adipogenesis and its relation to ectopic fat accumulation and cardiovascular risk." Atherosclerosis **241**(1): 27-35.

Hanada, M., J. Feng and B. A. Hemmings (2004). "Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target." Biochim Biophys Acta **1697**(1-2): 3-16.

Harms, M. J., J. Ishibashi, W. Wang, H. W. Lim, S. Goyama, T. Sato, M. Kurokawa, K. J. Won and P. Seale (2014). "Prdm16 is required for the maintenance of brown adipocyte identity and function in adult mice." Cell Metab **19**(4): 593-604.

Harris, M. I. and R. C. Eastman (2000). "Early detection of undiagnosed diabetes mellitus: a US perspective." Diabetes Metab Res Rev **16**(4): 230-236.

Hasan, A. U., K. Ohmori, T. Hashimoto, K. Kamitori, F. Yamaguchi, Y. Ishihara, N. Ishihara, T. Noma, M. Tokuda and M. Kohno (2014). "Valsartan ameliorates the constitutive adipokine expression pattern in mature adipocytes: a role for inverse agonism of the angiotensin II type 1 receptor in obesity." Hypertens Res **37**(7): 621-628.

He, H., D. Yang, L. Ma, Z. Luo, S. Ma, X. Feng, T. Cao, Z. Yan, D. Liu, M. Tepel and Z. Zhu (2010). "Telmisartan prevents weight gain and obesity through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-delta-dependent pathways." Hypertension **55**(4): 869-879.

Hocking, S. L., R. L. Stewart, A. E. Brandon, E. Suryana, E. Stuart, E. M. Baldwin, G. A. Kolumam, Z. Modrusan, J. R. Junutula, J. E. Gunton, M. Medynskyj, S. P. Blaber, E.

Karsten, B. R. Herbert, D. E. James, G. J. Cooney and M. M. Swarbrick (2015). "Subcutaneous fat transplantation alleviates diet-induced glucose intolerance and inflammation in mice." Diabetologia **58**(7): 1587-1600.

Hondares, E., M. Rosell, J. Diaz-Delfin, Y. Olmos, M. Monsalve, R. Iglesias, F. Villarroya and M. Giralt (2011). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) induces PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) gene expression and contributes to thermogenic activation of brown fat: involvement of PRDM16." J Biol Chem **286**(50): 43112-43122.

Hotamisligil, G. S., N. S. Shargill and B. M. Spiegelman (1993). "Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance." Science **259**(5091): 87-91.

Huang, C., L. Yuan and S. Cao (2015). "Endogenous GLP-1 as a key self-defense molecule against lipotoxicity in pancreatic islets." Int J Mol Med **36**(1): 173-185.

International Diabetes Federation Guideline Development, G. (2006). "Metabolic Syndrome Definition. The International Diabetes Federation (IDF) consensus worldwide definition of the metabolic syndrome."

International Diabetes Federation Guideline Development, G. (2014). "Global guideline for type 2 diabetes." Diabetes Res Clin Pract **104**(1): 1-52.

Ishibashi, J. and P. Seale (2010). "Medicine. Beige can be slimming." Science **328**(5982): 1113-1114.

Ishibashi, J. and P. Seale (2015). "Functions of Prdm16 in thermogenic fat cells." Temperature (Austin) **2**(1): 65-72.

Janikiewicz, J., K. Hanzelka, K. Kozinski, K. Kolczynska and A. Dobrzyn (2015). "Islet beta-cell failure in type 2 diabetes--Within the network of toxic lipids." Biochem Biophys Res Commun **460**(3): 491-496.

Johnson, J. D., N. T. Ahmed, D. S. Luciani, Z. Han, H. Tran, J. Fujita, S. Misler, H. Edlund and K. S. Polonsky (2003). "Increased islet apoptosis in Pdx1^{+/-} mice." J Clin Invest **111**(8): 1147-1160.

Kahn, S. E., R. L. Hull and K. M. Utzschneider (2006). "Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes." Nature **444**(7121): 840-846.

Kain, V. and G. V. Halade (2017). "Metabolic and Biochemical Stressors in Diabetic Cardiomyopathy." Front Cardiovasc Med **4**: 31.

Kajimura, S. (2015). "Engineering Fat Cell Fate to Fight Obesity and Metabolic Diseases." Keio J Med **64**(4): 65.

Kaschina E and U. T. (2003). "Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function." Blood Press **12**: 70-88.

Kato, M. (2004). "Human FOX gene family (Review)." Int J Oncol **25**(5): 1495-1500.

Katz, A., S. S. Nambi, K. Mather, A. D. Baron, D. A. Follmann, G. Sullivan and M. J. Quon (2000). "Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans." J Clin Endocrinol Metab **85**(7): 2402-2410.

Keipert, S. and M. Jastroch (2014). "Brite/beige fat and UCP1 - is it thermogenesis?" Biochim Biophys Acta **1837**(7): 1075-1082.

Kersten, S., B. Desvergne and W. Wahli (2000). "Roles of PPARs in health and disease." Nature **405**(6785): 421-424.

Kieffer, T. J. and J. F. Habener (2000). "The adipoinsular axis: effects of leptin on pancreatic beta-cells." Am J Physiol Endocrinol Metab **278**(1): E1-E14.

Kim, S. and N. Moustaid-Moussa (2000). "Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte." J Nutr **130**(12): 3110S-3115S.

Kintscher, U. (2012). "And in the end--Telmisartan directly binds to PPARgamma." Hypertens Res **35**(7): 704-705.

Kitamura, T. (2013). "The role of FOXO1 in beta-cell failure and type 2 diabetes mellitus." Nat Rev Endocrinol **9**(10): 615-623.

Kitamura, T. and Y. Ido Kitamura (2007). "Role of FoxO Proteins in Pancreatic beta Cells." Endocr J **54**(4): 507-515.

Kitamura, T., J. Nakae, Y. Kitamura, Y. Kido, W. H. Biggs, 3rd, C. V. Wright, M. F. White, K. C. Arden and D. Accili (2002). "The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic beta cell growth." J Clin Invest **110**(12): 1839-1847.

Kleiner, S., R. J. Mepani, D. Laznik, L. Ye, M. J. Jurczak, F. R. Jornayvaz, J. L. Estall, D. Chatterjee Bhowmick, G. I. Shulman and B. M. Spiegelman (2012). "Development of insulin resistance in mice lacking PGC-1alpha in adipose tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(24): 9635-9640.

Koh, E. J., S. J. Yoon and S. M. Lee (2013). "Losartan protects liver against ischaemia/reperfusion injury through PPAR-gamma activation and receptor for advanced glycation end-products down-regulation." Br J Pharmacol **169**(6): 1404-1416.

Kolditz, C. I. and D. Langin (2010). "Adipose tissue lipolysis." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **13**(4): 377-381.

Kooptiwut, S., S. Zraika, A. W. Thorburn, M. E. Dunlop, R. Darwiche, T. W. Kay, J. Proietto and S. Andrikopoulos (2002). "Comparison of insulin secretory function in two mouse models with different susceptibility to beta-cell failure." Endocrinology **143**(6): 2085-2092.

Lacy, P. E. and M. Kostianovsky (1967). "Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas." Diabetes **16**(1): 35-39.

Lafontan, M. and M. Berlan (1993). "Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function." J Lipid Res **34**(7): 1057-1091.

Langin, D. (2010). "Recruitment of brown fat and conversion of white into brown adipocytes: strategies to fight the metabolic complications of obesity?" Biochim Biophys Acta **1801**(3): 372-376.

Lebovitz, H. E. (2001). "Insulin resistance: definition and consequences." Exp Clin Endocrinol Diabetes **109 Suppl 2**: S135-148.

Lenzen, S. (2014). "A fresh view of glycolysis and glucokinase regulation: history and current status." J Biol Chem **289**(18): 12189-12194.

Li, M., M. Yang, X. Zhou, X. Fang, W. Hu, W. Zhu, C. Wang, D. Liu, S. Li, H. Liu, G. Yang and L. Li (2015). "Elevated circulating levels of irisin and the effect of metformin treatment in women with polycystic ovary syndrome." J Clin Endocrinol Metab **100**(4): 1485-1493.

Li, Y., X. Cao, L. X. Li, P. L. Brubaker, H. Edlund and D. J. Drucker (2005). "beta-Cell Pdx1 expression is essential for the glucoregulatory, proliferative, and cytoprotective actions of glucagon-like peptide-1." Diabetes **54**(2): 482-491.

Loncar, D., B. A. Afzelius and B. Cannon (1988). "Epididymal white adipose tissue after cold stress in rats. II. Mitochondrial changes." J Ultrastruct Mol Struct Res **101**(2-3): 199-209.

Lowell, B. B. and B. M. Spiegelman (2000). "Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis." Nature **404**(6778): 652-660.

M.O.Leal, A. and J. C. Voltarelli (2010). "Perspectivas da terapia com células-tronco para o diabetes mellitus tipo 2." Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.

Malachias, M., F. L. Plavnik, C. A. Machado, D. Malta, L. C. N. Scala and S. Fuchs (2016). "7th Brazilian Guideline of Arterial Hypertension: Chapter 1 - Concept, Epidemiology and Primary Prevention." Arq Bras Cardiol **107**(3 Suppl 3): 1-6.

Mandarim-de-Lacerda, C. A. (2003). "Stereological tools in biomedical research." An Acad Bras Cienc **75**(4): 469-486.

Mandarim-de-Lacerda, C. A., C. Fernandes-Santos and M. B. Aguilá (2010). "Image analysis and quantitative morphology." Methods Mol Biol **611**: 211-225.

Masamune, A., T. Watanabe, K. Kikuta and T. Shimosegawa (2009). "Roles of pancreatic stellate cells in pancreatic inflammation and fibrosis." Clin Gastroenterol Hepatol **7**(11 Suppl): S48-54.

- Masoodi, M., O. Kuda, M. Rossmeis, P. Flachs and J. Kopecky (2015). "Lipid signaling in adipose tissue: Connecting inflammation & metabolism." Biochim Biophys Acta **1851**(4): 503-518.
- Matthews, D. R., J. P. Hosker, A. S. Rudenski, B. A. Naylor, D. F. Treacher and R. C. Turner (1985). "Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man." Diabetologia **28**(7): 412-419.
- Meier, D. T., M. Morcos, T. Samarasekera, S. Zraika, R. L. Hull and S. E. Kahn (2014). "Islet amyloid formation is an important determinant for inducing islet inflammation in high-fat-fed human IAPP transgenic mice." Diabetologia **57**(9): 1884-1888.
- Meldrum, D. R., M. A. Morris and J. C. Gambone (2017). "Obesity pandemic: causes, consequences, and solutions-but do we have the will?" Fertil Steril **107**(4): 833-839.
- Muller-Fielitz, H., N. Hubel, M. Mildner, F. M. Vogt, J. Barkhausen and W. Raasch (2014). "Chronic blockade of angiotensin AT(1) receptors improves cardinal symptoms of metabolic syndrome in diet-induced obesity in rats." Br J Pharmacol **171**(3): 746-760.
- Muller-Fielitz, H., J. Landolt, M. Heidbreder, S. Werth, F. M. Vogt, O. Jöhren and W. Raasch (2012). "Improved insulin sensitivity after long-term treatment with AT1 blockers is not associated with PPARgamma target gene regulation." Endocrinology **153**(3): 1103-1115.
- Nakamura, A. and Y. Terauchi (2015). "Present status of clinical deployment of glucokinase activators." J Diabetes Investig **6**(2): 124-132.
- Nedergaard, J., T. Bengtsson and B. Cannon (2007). "Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans." Am J Physiol Endocrinol Metab **293**(2): E444-452.
- O'Donnell, C. J., P. M. Ridker, R. J. Glynn, K. Berger, U. Ajani, J. E. Manson and C. H. Hennekens (1997). "Hypertension and borderline isolated systolic hypertension increase risks of cardiovascular disease and mortality in male physicians." Circulation **95**(5): 1132-1137.
- Ohno, H., K. Shinoda, B. M. Spiegelman and S. Kajimura (2012). "PPARgamma agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein." Cell Metab **15**(3): 395-404.
- Olefsky, J. M. and C. K. Glass (2010). "Macrophages, inflammation, and insulin resistance." Annu Rev Physiol **72**: 219-246.
- Olivares-Reyes, J. A., A. Arellano-Plancarte and J. R. Castillo-Hernandez (2009). "Angiotensin II and the development of insulin resistance: implications for diabetes." Mol Cell Endocrinol **302**(2): 128-139.
- Organization, W. H. (2013). "A global brief on Hypertension: Silent killer, global public health crisis."
- Ornellas, F., V. S. Mello, C. A. Mandarim-de-Lacerda and M. B. Aguilá (2013). "Sexual dimorphism in fat distribution and metabolic profile in mice offspring from diet-induced obese mothers." Life Sci **93**(12-14): 454-463.

Ouchi, N., K. Ohashi, R. Shibata and T. Murohara (2012). "Adipocytokines and obesity-linked disorders." Nagoya J Med Sci **74**(1-2): 19-30.

Palomer, X., D. Alvarez-Guardia, R. Rodriguez-Calvo, T. Coll, J. C. Laguna, M. M. Davidson, T. O. Chan, A. M. Feldman and M. Vazquez-Carrera (2009). "TNF-alpha reduces PGC-1alpha expression through NF-kappaB and p38 MAPK leading to increased glucose oxidation in a human cardiac cell model." Cardiovasc Res **81**(4): 703-712.

Park, A., W. K. Kim and K. H. Bae (2014). "Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells." World J Stem Cells **6**(1): 33-42.

Peach (1977). "Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action." Physiol Rev **57**: 313-370.

Peirce, V., S. Carobbio and A. Vidal-Puig (2014). "The different shades of fat." Nature **510**(7503): 76-83.

Penna-de-Carvalho, A., F. Graus-Nunes, J. Rabelo-Andrade, C. A. Mandarim-de-Lacerda and V. Souza-Mello (2014). "Enhanced pan-peroxisome proliferator-activated receptor gene and protein expression in adipose tissue of diet-induced obese mice treated with telmisartan." Exp Physiol **99**(12): 1663-1678.

Perlstein, T. S., R. R. Henry, K. J. Mather, M. R. Rickels, N. I. Abate, S. M. Grundy, Y. Mai, J. B. Albu, J. B. Marks, J. L. Pool and M. A. Creager (2012). "Effect of angiotensin receptor blockade on insulin sensitivity and endothelial function in abdominally obese hypertensive patients with impaired fasting glucose." Clin Sci (Lond) **122**(4): 193-202.

Piantadosi, C. A. and H. B. Suliman (2006). "Mitochondrial transcription factor A induction by redox activation of nuclear respiratory factor 1." J Biol Chem **281**(1): 324-333.

Pirola, L. and J. C. Ferraz (2017). "Role of pro- and anti-inflammatory phenomena in the physiopathology of type 2 diabetes and obesity." World J Biol Chem **8**(2): 120-128.

PK, W. (2017). "ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults."

Polonsky, K. S., B. D. Given, L. J. Hirsch, H. Tillil, E. T. Shapiro, C. Beebe, B. H. Frank, J. A. Galloway and E. Van Cauter (1988). "Abnormal patterns of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus." N Engl J Med **318**(19): 1231-1239.

Pradol, W. L. d. (2009). "Obesidade e adipocinas inflamatórias: implicações práticas para a prescrição de exercício." **15**.

Rachid, T. L., A. Penna-de-Carvalho, I. Bringhenti, M. B. Aguila, C. A. Mandarim-de-Lacerda and V. Souza-Mello (2015). "Fenofibrate (PPARalpha agonist) induces beige cell formation in subcutaneous white adipose tissue from diet-induced male obese mice." Mol Cell Endocrinol **402**: 86-94.

- Rachid, T. L., A. Penna-de-Carvalho, I. Bringhenti, M. B. Aguila, C. A. Mandarim-de-Lacerda and V. Souza-Mello (2015). "PPAR-alpha agonist elicits metabolically active brown adipocytes and weight loss in diet-induced obese mice." Cell Biochem Funct **33**(4): 249-256.
- Ramos, D. C. and A. C. G. Casali (2012). "Antagonistas dos receptores da angiotensina II: uma revisão de classe." Revista Saúde e Desenvolvimento.
- Rasouli, N. and P. A. Kern (2008). "Adipocytokines and the metabolic complications of obesity." J Clin Endocrinol Metab **93**(11 Suppl 1): S64-73.
- Reagan-Shaw, S., M. Nihal and N. Ahmad (2008). "Dose translation from animal to human studies revisited." FASEB J **22**(3): 659-661.
- Reaven, G. M. (2011). "The metabolic syndrome: time to get off the merry-go-round?" J Intern Med **269**(2): 127-136.
- Reeves, P. G., F. H. Nielsen and G. C. Fahey, Jr. (1993). "AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet." J Nutr **123**(11): 1939-1951.
- Reinert, R. B., M. Brissova, A. Shostak, F. C. Pan, G. Poffenberger, Q. Cai, G. L. Hundemer, J. Kantz, C. S. Thompson, C. Dai, O. P. McGuinness and A. C. Powers (2013). "Vascular endothelial growth factor-a and islet vascularization are necessary in developing, but not adult, pancreatic islets." Diabetes **62**(12): 4154-4164.
- Richard, D., A. C. Carpentier, G. Dore, V. Ouellet and F. Picard (2010). "Determinants of brown adipocyte development and thermogenesis." Int J Obes (Lond) **34 Suppl 2**: S59-66.
- Roca-Rivada, A., C. Castela, L. L. Senin, M. O. Landrove, J. Baltar, A. Belen Crujeiras, L. M. Seoane, F. F. Casanueva and M. Pardo (2013). "FNDC5/irisin is not only a myokine but also an adipokine." PLoS One **8**(4): e60563.
- Rodriguez, A., S. Ezquerro, L. Mendez-Gimenez, S. Becerril and G. Frühbeck (2015). "Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism." Am J Physiol Endocrinol Metab **309**(8): E691-714.
- Sachdeva, M. M., K. C. Claiborn, C. Khoo, J. Yang, D. N. Groff, R. G. Mirmira and D. A. Stoffers (2009). "Pdx1 (MODY4) regulates pancreatic beta cell susceptibility to ER stress." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(45): 19090-19095.
- Sanchez-Gurmaches, J. and D. A. Guertin (2014). "Adipocyte lineages: tracing back the origins of fat." Biochim Biophys Acta **1842**(3): 340-351.
- Santos, S. H., L. R. Fernandes, C. S. Pereira, A. L. Guimaraes, A. M. de Paula, M. J. Campagnole-Santos, J. I. Alvarez-Leite, M. Bader and R. A. Santos (2012). "Increased circulating angiotensin-(1-7) protects white adipose tissue against development of a proinflammatory state stimulated by a high-fat diet." Regul Pept **178**(1-3): 64-70.
- SBD (2017). "Posicionamento Oficial SBD nº 02/2017. CONDUTA TERAPÊUTICA NO DIABETES TIPO 2: ALGORITMO SBD 2017."

SBD (2016). "Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016)." AC FARMACÊUTICA LTDA.

Scarpulla, R. C. (2002). "Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells." Gene **286**(1): 81-89.

Schwitzgebel, V. M., A. Mamin, T. Brun, B. Ritz-Laser, M. Zaiko, A. Maret, F. R. Jornayvaz, G. E. Theintz, O. Michielin, D. Melloul and J. Philippe (2003). "Agenesis of human pancreas due to decreased half-life of insulin promoter factor 1." J Clin Endocrinol Metab **88**(9): 4398-4406.

Seale, P. (2015). "Transcriptional Regulatory Circuits Controlling Brown Fat Development and Activation." Diabetes **64**(7): 2369-2375.

Seale, P., H. M. Conroe, J. Estall, S. Kajimura, A. Frontini, J. Ishibashi, P. Cohen, S. Cinti and B. M. Spiegelman (2011). "Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice." J Clin Invest **121**(1): 96-105.

Shabalina, I. G., N. Petrovic, J. M. de Jong, A. V. Kalinovich, B. Cannon and J. Nedergaard (2013). "UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic." Cell Rep **5**(5): 1196-1203.

Shao, C., I. H. Zucker and L. Gao (2013). "Angiotensin type 2 receptor in pancreatic islets of adult rats: a novel insulinotropic mediator." Am J Physiol Endocrinol Metab **305**(10): E1281-1291.

SILVA, P. (2010). Farmacologia.

Smith, P. M., C. C. Hindmarch, D. Murphy and A. V. Ferguson (2014). "AT1 receptor blockade alters nutritional and biometric development in obesity-resistant and obesity-prone rats submitted to a high fat diet." Front Psychol **5**: 832.

Souza-Mello, V., B. M. Gregorio, F. S. Cardoso-de-Lemos, L. de Carvalho, M. B. Aguilá and C. A. Mandarim-de-Lacerda (2010). "Comparative effects of telmisartan, sitagliptin and metformin alone or in combination on obesity, insulin resistance, and liver and pancreas remodelling in C57BL/6 mice fed on a very high-fat diet." Clin Sci (Lond) **119**(6): 239-250.

Souza-Mello, V., B. M. Gregorio, B. Relvas-Lucas, T. da Silva Faria, M. B. Aguilá and C. A. Mandarim-de-Lacerda (2011). "Pancreatic ultrastructural enhancement due to telmisartan plus sitagliptin treatment in diet-induced obese C57BL/6 mice." Pâncreas **40**(5): 715-722.

Spiegelman, B. M. (2013). "Banting Lecture 2012: Regulation of adipogenesis: toward new therapeutics for metabolic disease." Diabetes **62**(6): 1774-1782.

Stitzel, M. L., I. Kycia, R. Kursawe and D. Ucar (2015). "Transcriptional Regulation of the Pancreatic Islet: Implications for Islet Function." Curr Diab Rep **15**(9): 66.

Swinburn, B. A., G. Sacks, K. D. Hall, K. McPherson, D. T. Finegood, M. L. Moodie and S. L. Gortmaker (2011). "The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments." Lancet **378**(9793): 804-814.

- Thorens, B. (2015). "GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis." Diabetologia **58**(2): 221-232.
- Tilg, H. and A. R. Moschen (2006). "Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity." Nat Rev Immunol **6**(10): 772-783.
- Tremmel, M., U. G. Gerdtham, P. M. Nilsson and S. Saha (2017). "Economic Burden of Obesity: A Systematic Literature Review." Int J Environ Res Public Health **14**(4).
- Tzanavari, T., P. Giannogonas and K. P. Karalis (2010). "TNF-alpha and obesity." Curr Dir Autoimmun **11**: 145-156.
- Valtat, B., C. Dupuis, D. Zenaty, A. Singh-Estivalet, F. Tronche, B. Breant and B. Blondeau (2011). "Genetic evidence of the programming of beta cell mass and function by glucocorticoids in mice." Diabetologia **54**(2): 350-359.
- van der Zijl, N. J., C. C. Moors, G. H. Goossens, E. E. Blaak and M. Diamant (2012). "Does interference with the renin-angiotensin system protect against diabetes? Evidence and mechanisms." Diabetes Obes Metab **14**(7): 586-595.
- van Raalte, D. H., N. J. van der Zijl and M. Diamant (2010). "Pancreatic steatosis in humans: cause or marker of lipotoxicity?" Curr Opin Clin Nutr Metab Care **13**(4): 478-485.
- van Zwieten, P. A. (2006). "Angiotensin II receptor antagonists (AT1-blockers, ARBs, sartans): similarities and differences." Neth Heart J **14**(11): 381-387.
- Velloso, L. A., F. Folli, L. Perego and M. J. Saad (2006). "The multi-faceted cross-talk between the insulin and angiotensin II signaling systems." Diabetes Metab Res Rev **22**(2): 98-107.
- Vickers, M. H., S. Reddy, B. A. Ikenasio and B. H. Breier (2001). "Dysregulation of the adipoinular axis -- a mechanism for the pathogenesis of hyperleptinemia and adipogenic diabetes induced by fetal programming." J Endocrinol **170**(2): 323-332.
- Watada, H., Y. Kajimoto, Y. Umayahara, T. Matsuoka, H. Kaneto, Y. Fujitani, T. Kamada, R. Kawamori and Y. Yamasaki (1996). "The human glucokinase gene beta-cell-type promoter: an essential role of insulin promoter factor 1/PDX-1 in its activation in HIT-T15 cells." Diabetes **45**(11): 1478-1488.
- Webera, M. A., E. L. S. , W. B. W. , S. M. , L. H. L. , , J. G. Kenersonf, J. M. F. , B. L. C. , B. J. M. , C. V. S. R. , , D. L. Cohenk, J.-C. C. , R. R. J.-C. , Sandra Talern, D. K. , , R. Townsendp, J. C. , A. J. R. , G. L. B. , J. W. , , A. E. Schutteu, J. D. B. , R. M. T. , Dominic Sicax and a. S. B. H. (2014). "Clinical Practice Guidelines for the Management of Hypertension in the Community A Statement by the American Society of Hypertension and the International Society of Hypertension." Journal of Hypertension.
- Whittle, A. J., S. Carobbio, L. Martins, M. Slawik, E. Hondares, M. J. Vazquez, D. Morgan, R. I. Csikasz, R. Gallego, S. Rodriguez-Cuenca, M. Dale, S. Virtue, F. Villarroya, B. Cannon, K. Rahmouni, M. Lopez and A. Vidal-Puig (2012). "BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions." Cell **149**(4): 871-885.

- Winkler, M., J. Schuchard, I. Stolting, F. M. Vogt, J. Barkhausen, C. Thorns, M. Bader and W. Raasch (2016). "The brain renin-angiotensin system plays a crucial role in regulating body weight in diet-induced rat obesity." Br J Pharmacol.
- Wintour, E. M. and B. A. Henry (2006). "Glycerol transport: an additional target for obesity therapy?" Trends Endocrinol Metab **17**(3): 77-78.
- Wree, A., A. Kahraman, G. Gerken and A. Canbay (2011). "Obesity affects the liver - the link between adipocytes and hepatocytes." Digestion **83**(1-2): 124-133.
- Wronska, A. and Z. Kmiec (2012). "Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots." Acta Physiol (Oxf) **205**(2): 194-208.
- Wu, J., P. Bostrom, L. M. Sparks, L. Ye, J. H. Choi, A. H. Giang, M. Khandekar, K. A. Virtanen, P. Nuutila, G. Schaart, K. Huang, H. Tu, W. D. van Marken Lichtenbelt, J. Hoeks, S. Enerback, P. Schrauwen and B. M. Spiegelman (2012). "Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human." Cell **150**(2): 366-376.
- Wu, J., P. Cohen and B. M. Spiegelman (2013). "Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown?" Genes Dev **27**(3): 234-250.
- Wu, M. V., G. Bikopoulos, S. Hung and R. B. Ceddia (2014). "Thermogenic capacity is antagonistically regulated in classical brown and white subcutaneous fat depots by high-fat diet and endurance training in rats: Impact on whole-body energy expenditure." J Biol Chem.
- Yadav, A., M. A. Kataria and V. Saini (2013). "Role of leptin and adiponectin in insulin resistance." Clin Chim Acta **417**: 80-84.
- Yang, B. T., T. A. Dayeh, P. A. Volkov, C. L. Kirkpatrick, S. Malmgren, X. Jing, E. Renstrom, C. B. Wollheim, M. D. Nitert and C. Ling (2012). "Increased DNA methylation and decreased expression of PDX-1 in pancreatic islets from patients with type 2 diabetes." Mol Endocrinol **26**(7): 1203-1212.
- Yin, F. C., H. A. Spurgeon, K. Rakusan, M. L. Weisfeldt and E. G. Lakatta (1982). "Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat." Am J Physiol **243**(6): H941-947.
- Yoon, K. H., S. H. Ko, J. H. Cho, J. M. Lee, Y. B. Ahn, K. H. Song, S. J. Yoo, M. I. Kang, B. Y. Cha, K. W. Lee, H. Y. Son, S. K. Kang, H. S. Kim, I. K. Lee and S. Bonner-Weir (2003). "Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea." J Clin Endocrinol Metab **88**(5): 2300-2308.
- Young, C. N., D. A. Morgan, S. D. Butler, K. Rahmouni, S. B. Gurley, T. M. Coffman, A. L. Mark and R. L. Davisson (2015). "Angiotensin type 1a receptors in the forebrain subfornical organ facilitate leptin-induced weight loss through brown adipose tissue thermogenesis." Mol Metab **4**(4): 337-343.
- Young, P., J. R. Arch and M. Ashwell (1984). "Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse." FEBS Lett **167**(1): 10-14.

Younis, F., Y. Oron, R. Limor, N. Stern and T. Rosenthal (2012). "Prophylactic treatment with telmisartan induces tissue-specific gene modulation favoring normal glucose homeostasis in Cohen-Rosenthal diabetic hypertensive rats." Metabolism **61**(2): 164-174.

Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold and J. M. Friedman (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." Nature **372**(6505): 425-432.


Zhang, Y., C. Ren, G. Lu, Z. Mu, W. Cui, H. Gao and Y. Wang (2014). "Anti-diabetic effect of mulberry leaf polysaccharide by inhibiting pancreatic islet cell apoptosis and ameliorating insulin secretory capacity in diabetic rats." Int Immunopharmacol **22**(1): 248-257.

Zhao, S., L. K. Chan, L. Chen, T. W. Cheng, T. Klein and P. S. Leung (2015). "Combination of Telmisartan and Linagliptin Preserves Pancreatic Islet Cell Function and Morphology in db/db Mice." Pâncreas.

Zhao, S., L. K. Chan, L. Chen, T. W. Cheng, T. Klein and P. S. Leung (2016). "Combination of Telmisartan and Linagliptin Preserves Pancreatic Islet Cell Function and Morphology in db/db Mice." Pâncreas **45**(4): 584-592.



AT1 receptor antagonist induces thermogenic beige adipocytes in the inguinal white adipose tissue of obese mice

Francielle Graus-Nunes¹ · Tamiris Lima Rachid¹ · Felipe de Oliveira Santos¹ · Sandra Barbosa-da-Silva¹ · Vanessa Souza-Mello¹ 

Received: 2 September 2016 / Accepted: 15 December 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract

Purpose To evaluate whether losartan is able to induce beige adipocytes formation, focusing on the thermogenic gene expression and adipocyte remodeling in the subcutaneous white adipose tissue of diet-induced obese mice. **Methods** Male C57BL/6 mice received a control diet (10% energy as lipids) or a high-fat diet (50% energy as lipids) for 10 weeks, followed by a 5-week treatment with losartan: control group, control-losartan group (10 mg/Kg/day), high-fat group and high-fat-losartan group (10 mg/Kg/day). Biochemical, morphometrical, stereological and molecular approaches were used to evaluate the outcomes.

Results The high-fat diet elicited overweight, insulin resistance and adipocyte hypertrophy in the high-fat group, all of which losartan rescued in the high-fat-losartan group. These effects comply with the induction of beige adipocytes within the inguinal fat pads in high-fat-losartan group as they exhibited the greatest energy expenditure among the groups along with the presence uncoupling protein 1 positive multilocular adipocytes with enhanced peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha and PR domain containing 16 mRNA levels, indicating a significant potential for mitochondrial biogenesis and adaptive thermogenesis.

Conclusions Our results show compelling evidence that losartan countered diet-induced obesity in mice by enhancing energy expenditure through beige adipocytes induction. Reduced body mass, increased insulin sensitivity,

decreased adipocyte size and marked expression of uncoupling protein 1 by ectopic multilocular adipocytes support these findings. The use of losartan as a coadjutant medicine to tackle obesity and its related disorders merits further investigation.

Keywords Losartan · Beige adipocyte · Inguinal fat · Obesity · UCP1 · PRDM16

Introduction

Lipotoxicity underpins obesity and its comorbidities onset [1]. White adipose tissue (WAT) undergoes severe hypertrophy and hyperplasia as a positive energy balance is established, triggering insulin resistance (IR) and pro-inflammatory adipokine release [2]. In the long run, WAT becomes unable to buffer the excessive free fatty acids, which are driven to ectopic depots, impairing organs functioning and maximizing IR [3]. A viable strategy to tackle obesity and its metabolic alterations is to enhance energy expenditure (EE) by stimulating adaptive thermogenesis [4].

EE encompasses three elements: obligatory (to keep normal functioning of cells and organs), physical activity and adaptive thermogenesis (shivering or non-shivering) [5]. Non-shivering thermogenesis (NST), the potential to dissipate surplus energy intake into heat, has been considered as an exclusive feature of brown adipose tissue (BAT). However, recent evidences show that ectopic uncoupling protein 1 (UCP1) expression along with a gene expression profile similar to brown adipocytes induces subcutaneous WAT (sWAT) to acquire BAT features

✉ Vanessa Souza-Mello
souzamello.uej@gmail.com

¹ Laboratory of Morphometry, Metabolism and Cardiovascular disease, Biomedical Centre, Institute of Biology, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Endocrinology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mce

Differential effects of angiotensin receptor blockers on pancreatic islet remodelling and glucose homeostasis in diet-induced obese mice



Francielle Graus-Nunes, Thatiany de Souza Marinho, Sandra Barbosa-da-Silva, Marcia Barbosa Aguilu, Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda, Vanessa Souza-Mello^{*,1}

Laboratory of Morphometry, Metabolism and Cardiovascular Disease, Biomedical Centre, Institute of Biology, State University of Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 April 2010

Received in revised form

21 October 2010

Accepted 21 October 2010

Available online 22 October 2010

Keywords:

Pancreatic islet

Telmisartan

Losartan

Glucose homeostasis

High-fat diet

Apoptosis

ABSTRACT

Obesity leads to adverse endocrine pancreas remodelling, reduced islet lifespan and early type 2 diabetes onset. AT1R blockade shows beneficial pleiotropic effects. This study sought to compare the effects of losartan and telmisartan on pancreatic islets remodelling and glucose homeostasis in diet-induced obese mice. High-fat diet yielded overweight, insulin resistance, islet apoptosis and hypertrophy. Suitable insulin levels and preserved endocrine pancreas structure were correlated to adequate AKT-FOXO1 pathway functioning in losartan-treated animals. Conversely, telmisartan yielded enhanced PDX1 and GLP-1 islet expression along with greater GLP-1 levels, with the consequent better islet glucose sensing and uptake. Greater islet vascularisation coupled with reduced apoptosis and macrophage infiltration seems to underlie the beneficial findings in both treatments. In conclusion, these results provide compelling evidence that two antihypertensive drugs (telmisartan and losartan) ameliorate pancreatic islet structure, glucose handling, and vascularisation in obese mice. Although only telmisartan countered overweight, both drugs yielded reduced apoptosis and islet preservation, with translational potential.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Obesity has reached epidemic proportions and frequently stems from increased fat intake and physical inactivity (Seidell and Halberstadt, 2015). Adipose tissue capacity to buffer excessive exogenous or endogenous free fatty acids (FFA) is limited and the resulting increased leptin release from enlarged adipocytes triggers hyperinsulinemia, which is related to adverse pancreatic islet remodelling (Gustafson and Smith, 2015).

The pancreas is one of the most affected organs by lipotoxicity (van Raalte et al., 2010). It has been previously reported that high-fat feeding leads to enlarged pancreatic islets as an attempt to keep normal values of blood glucose at the expense of hyperinsulinemia (Janikiewicz et al., 2015; Souza-Mello et al., 2010). As lipotoxicity becomes chronic, glucose intolerance takes place and, at this stage, pancreatic islets present with altered metabolic pathways, besides a structural disarrangement (Del Guerra et al., 2005; Souza-Mello

et al., 2011). These alterations threaten the survival of pancreatic islets, which tend to become dysfunctional due to a highly demanding for insulin and glucagon synthesis (Cerf, 2007).


Insulin resistance precedes type 2 diabetes onset in at least ten years. During this period, pancreatic islet undergoes a series of structural, functional and metabolic remodelling. Pancreatic duodenal homeobox 1 (PDX1) islet expression is essential to induce adequate expression of glucokinase (GK) and glucose transporter 2 (GLUT2), which mediate glucose sensing and uptake by the islet and ensures beta cell function and islet preservation (Cerf, 2007; Stitzel et al., 2015).

The use of angiotensin receptor blockers (ARBs) has unravelled pleiotropic effects on pancreatic structure and glucose homeostasis (Souza-Mello et al., 2010; Zhao et al., 2010). The inhibition of angiotensin type 1 receptor (AT1R) in endocrine pancreas favours angiotensin type 2 receptor (AT2R) actions, which seems to cause islet preservation (Shao et al., 2013). Besides a better coupling between glucose sensing and uptake by beta cells, antiapoptotic effects and greater islet vascularisation play a major role in islet preservation (Bonora, 2008). In this context, unlike losartan (a pure ARB), telmisartan is also a partial peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma agonist, which is suggestive of additive beneficial effects on islet morphology and physiology (Bhatia and


* Corresponding author. Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doença Cardiovascular, Centro Biomedico, Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av 28 de Setembro 87 s/n, 20551-030, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
E-mail address: souzamellemo@igmail.com (V. Souza-Mello).

¹ Website: www.lmmc.uerj.br.

ANEXO – Comitê de Ética



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/013/2015 sobre "Ativação do PPAR beta/delta pela telmisartana: modulação do eixo adipoinssular e enteroinsular na lipotoxicidade" sob a responsabilidade de Vanessa de Souza Mello, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA), em 24/02/2015. Este certificado expira em 24/02/2019.

Rio de Janeiro, 24 de Fevereiro de 2015.

Patricia C. Lisboa

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ

Elaine de Oliveira

Profa. Dra. Elaine de Oliveira
CEUA/IBRAG/UERJ

Israel Felzenszwalb

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb
CEUA/IBRAG/UERJ

Sylvio Claudio Neto

Dr. Sylvio Claudio Neto
CEUA/IBRAG/UERJ