

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Fisiologia e Biofísica  
Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas –Fisiologia e  
Farmacologia.

***Ação do agonista não-peptídico da  
angiotensina-(1-7), AVE 0991, nas alterações  
metabólicas induzidas por suplementação com  
frutose.***

Doutoranda: Ms. Érica Guilhen Mario  
Orientadora: Profa. Dra. Leida Maria Botion

Belo Horizonte  
2012

**Érica Guilhen Mario**

***Ação do agonista não-peptídico da  
angiotensina-(1-7), AVE 0991, nas alterações  
metabólicas induzidas por suplementação com  
frutose.***

Tese de doutorado apresentado ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológica – Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Leida Maria Botion.

**Belo Horizonte**

**2012**

**Dedico esse trabalho a minha família nas  
pessoas de meu pai Gilberto, minha mãe Clélia  
e meu irmão Éverton e ao querido Alexandre.**

## Agradecimentos

A Deus, muito obrigada pela dádiva da vida e por estar sempre presente em cada passo da minha trajetória.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Leida Maria Botion pela sua orientação e profissionalismo, imprescindíveis na minha formação científica.

Ao Prof. Dr. Robson Augusto S Santos por ter confiado em meu trabalho e por ter cedido os animais do biotério do laboratório de hipertensão e o AVE0991.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gleydes Gambogi Parreira e Dr<sup>a</sup> Gelide Avelar ambas do Departamento de Morfologia que me ajudaram na análise histológica.

Ao Prof<sup>o</sup> Almir Sousa Martins pela ajuda imensurável no PCR.

A todos os professores do Departamento de Fisiologia e Biofísica que contribuíram para a minha formação.

Aos colegas de laboratório Angélica Heringer, Carolina Campos Lima Moreira, Fabíola Cesário (in memoriam), Letícia Cordeiro e Williane Mendes pelo convívio, troca de idéias e grande ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

Seria impossível listar todos os grandes amigos que fiz durante esses anos e que agora são parte da minha vida.

A todos vocês meu muito obrigado!!!!

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>v</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 Regulação do metabolismo	1
1.1.1 Regulação endócrina do metabolismo intermediário	1
1.1.2 Regulação gênica do metabolismo intermediário	3
1.1.3 Controle nutricional do metabolismo intermediário	4
1.2 Utilização da frutose como modelo de resistência insulínica.	6
1.3 Sistema renina-angiotensina	10
1.3.1 Ações clássicas dos peptídeos angiotensinérgicos.	10
1.3.2 Sistema renina angiotensina e metabolismo intermediário	13
1.4 AVE 0991, primeiro análogo da angiotensina-(1-7).	14
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
2.1 Objetivos específicos	17
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>18</b>
3.1 Animais e seu tratamento	18
3.2 Metodologias	18
3.2.1 Teste oral de tolerância à glicose e teste de sensibilidade à insulina	18
3.2.2 Perfil plasmático	19
3.2.3.Determinação do conteúdo hepático de glicogênio	19

3.2.4	Determinação do conteúdo de lipídios totais e triacilglicerol	19
3.2.5	Análise histológica do fígado em microscopia de luz	20
..... 3.2.5.1	Processamento do material para análise em microscopia de luz	20
3.2.5.2	Análise histológica dos hepatócitos	20
3.2.5.2.1	Medida ds diâmetros nucleares	20
3.2.5.2.2	Proporção volumétrica	21
3.2.5.2.3	Volume celular	21
3.2.5.2.4	Volume ocupado pelas gotículas lipídicas	21
3.2.6	Avaliação da secreção hepática de VLDL-TAG	21
3.2.7	Quantificação da expressão do RNAm por reação em cadeia da polimerase : em tempo real (qRT-PCR)	22
3.2.7.1	Extração do RNA total	22
3.2.7.2	Eliminação de moléculas de DNA genômico de amostra de RNA total.	22
3.2.7.3	Quantificação do RNA total e transcrição reversa	22
3.2.7.4	PCR Semi – Quantitativo	23
3.2.8	Medida da atividade da lipase lipoprotéica (LPL)	24
3.3	Análise dos dados	25
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>26</b>
4.1	Parâmetros Gerais	26
4.1.1	Peso corporal	26
4.1.2	Parâmetros biométricos e séricos	27
4.1.3	Teste oral de tolerância a glicose e de sensibilidade a insulina.	28
4.2	Parâmetros Hepáticos	29
4.2.1.	Conteúdo de glicogênio	29
4.2.2.	Conteúdo hepático de lipídios totais	29

4.2.3 Histologia do tecido hepático	30
4.2.3.1 Prancha dos cortes histológicos e morfometria do hepatócito	30
4.2.4. Secreção hepática de triacilgliceróis	31
4.2.5 Expressão hepática de genes envolvidos na síntese lipídica	32
4.2.6 Expressão genes envolvidos na oxidação hepática de lipídios	33
4.3 Parâmetros Musculares	34
4.3.1 Atividade da enzima lipase lipoproteica e quantificação de triacilgliceróis muscular	34
4.3.2 Expressão de genes envolvidos na síntese de lipídios pelo tecido muscular	35
4.3.3 Expressão de genes envolvidos na oxidação muscular de lipídios	36
4.4 Parâmetros do tecido adiposo epididimal	37
4.4.1 Atividade da enzima lipase lipoproteica	37
4.4.2 Expressão de genes envolvidos na síntese lipídica	38
<b>5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO</b>	<b>39</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>50</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Esquema das principais ações do PPAR $\alpha$ e PPAR $\gamma$ sobre os órgãos-alvos no controle do metabolismo intermediário	<b>4</b>
<b>Figura 2:</b> Esquema da ação de frutose no desenvolvimento da síndrome metabólica	<b>8</b>
<b>Figura 3:</b> Ação da frutose no desenvolvimento do acúmulo lipídico hepático e sua contribuição para o desenvolvimento da resistência insulínica periférica	<b>9</b>
<b>Figura 4.</b> Diagrama simplificado da cascata de formação e de degradação das principais angiotensinas	<b>12</b>
<b>Figura 5:</b> Estrutura química do AVE 0991	<b>15</b>
<b>Figura 6:</b> Evolução ponderal e ganho de peso	<b>26</b>
<b>Figura 7:</b> Teste oral de tolerância à glicose e teste de sensibilidade à insulina em ratos controles ou suplementados com frutose e tratados com AVE0991	<b>28</b>
<b>Figura 8:</b> Conteúdo de glicogênio do fígado de animais controles e suplementados com frutose, tratados ou não com AVE0991.	<b>29</b>
<b>Figura 9:</b> Conteúdo de lipídios totais do fígado de ratos controles suplementados com frutose na água de beber e tratados com AVE0991	<b>29</b>
<b>Figura 10:</b> Cortes histológico de fígado de animais controle,animais controle tratado com AVE 0991 animais frutose animais frutose tratados com AVE 0991	<b>30</b>
<b>Figura 11:</b> Taxa de secreção hepática de triacilgliceróis pelos hepatócitos dos ratos controles ou suplementados com frutose e tratdos com AVE 0991	<b>31</b>
<b>Figura 12:</b> Efeito da suplementação com frutose e tratamento com AVE 0991 na expressão de RNAm do genes PPAR- $\gamma$ , SREBP-1c.	<b>32</b>



<b>Figura 13:</b> Efeito da suplementação de frutose e do tratamento com AVE 0991 na expressão hepática de RNAm do PPAR- $\alpha$ (unidade arbitrária), carnitina palmitoil transferase-1 e acil-CoA oxidase.	<b>33</b>
<b>Figura 14:</b> Ação da suplementação com frutose e do tratamento com AVE 0991 na atividade enzimática da lipase lipoproteica e na concentração de triacilgliceróis do tecido muscular.	<b>34</b>
<b>Figura 15:</b> Efeito da suplementação com frutose e do tratamento com AVE 0991 na expressão gênica PPAR- $\gamma$ , SREBP-1c .	<b>35</b>
<b>Figura 16:</b> Efeito da suplementação de frutose e tratamento com AVE 0991 na expressão dos genes envolvidos na oxidação lipídica: PPAR- $\alpha$ , carnitina palmitoil transferase-1 e acil-CoA oxidase.	<b>36</b>
<b>Figura 17:</b> Efeito da suplementação com frutose e tratamento com AVE 0991 na atividade enzimática da lipase lipoproteica no tecido adiposo epididimal.	<b>37</b>
<b>Figura 18:</b> Efeito da suplementação com frutose e do tratamento com AVE 0991 sobre a expressão de RNAm dos genes envolvidos na síntese lipídica: SREBP-1c, PPAR- $\gamma$ .	<b>38</b>
<b>Figura 19:</b> Esquema resumindo os efeitos da suplementação com frutose comparado com dieta padrão.	<b>47</b>
<b>Figura 20:</b> Esquema dos efeitos do tratamento oral com AVE0991 em animais suplementados com frutose	<b>48</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Primers para PCR em tempo real	<b>24</b>
<b>Tabela 2:</b> Efeitos dos diferentes tratamentos sobre parâmetros biométricos e séricos	<b>27</b>
<b>Tabela 3:</b> Efeito da suplementação com frutose e do tratamento com AVE 0991 na análise morfométrica dos hepatócitos de ratos Sprague-Dawley	<b>31</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A manutenção da homeostase energética é dependente de processos bioquímicos e fisiológicos que ajustam o metabolismo de carboidratos e de lipídios a fim de manter a normoglicemia e a normolipidemia. Para isto, é necessária a ação integrada do fígado, músculo e tecido adiposo, os quais desempenham papel fundamental na fornecimento e utilização de substratos metabólicos.

### 1.1 Regulação do metabolismo

A ação conjunta do fígado, músculo esquelético e tecido adiposo para a manutenção da homeostase metabólica é dependente da regulação: 1) neuro-endócrina; 2) gênica e 3) nutricional.

#### 1.1.1 Regulação endócrina do metabolismo intermediário.

A manutenção dos níveis glicêmicos e lipídicos deve-se a uma ação integrada e finamente regulada por hormônios. Quando há um excesso de substratos energéticos na corrente sanguínea, como por exemplo, logo após uma refeição, esses substratos são armazenados através da ação de hormônios anabólicos como a insulina. Por outro lado, quando há uma demanda energética como durante o jejum ou atividade física, as reservas energéticas são degradadas por ação de hormônios catabólicos como o glucagon, as catecolaminas entre outros .

As catecolaminas, como a adrenalina e a noradrenalina também disponibilizam substratos energéticos quando há demanda energética. As catecolaminas agem no tecido adiposo promovendo a lipólise, ou seja, a hidrólise dos triacilgliceróis estocados em glicerol e ácidos graxos. A noradrenalina, um neurotransmissor do sistema nervoso simpático e a adrenalina, hormônio secretado pela medula da supra-renal, agem via adrenoceptores beta presentes no tecido adiposo (Langin, 2006) e promovem a fosforilação e ativação da lipase hormônio sensível (HSL) em resíduos de serina (Garton *et al.*, 1988; Garton *et al.*, 1989). A ativação da HSL leva a degradação de triacilglicerol em glicerol e ácidos graxos livres e subsequente liberação para a corrente sanguínea (Egan *et al.*, 1992). O glicerol pode ser utilizado como substrato gliconeogênico no fígado enquanto que os ácidos graxos podem sofrer  $\beta$ -oxidação no músculo e no fígado podem ser estocados, oxidados ou sofrerem conversão a corpos cetônicos.

A ação de hormônios catabólicos no tecido adiposo disponibiliza ácidos graxos não-esterificados (AGNE) como combustível oxidativo, bloqueando a captação e utilização de glicose por tecidos como músculo esquelético e cardíaco (Randle *et al.*, 1963). O impedimento da utilização de glicose durante o diabetes mellitus, causando um distúrbio no metabolismo de carboidrato pode ser em parte devido ao aumento da liberação de AGNE das reservas de triacilglicerol do tecido adiposo (Randle *et al.*, 1963).

O glucagon é um importante hormônio regulador da produção hepática de glicose durante o jejum e exercício físico. Em resposta a um aumento na concentração plasmática de glucagon, a produção hepática de glicose é rapidamente estimulada, sendo que este aumento deve-se ao aumento da glicogenólise, com pouco ou nenhum efeito sobre a gliconeogênese (Ramnanan *et al.*, 2011). Desta forma, o aumento da disponibilidade de glicose restabelece a glicemia durante a hipoglicemia de jejum ou fornecer glicose para a atividade muscular durante o exercício físico.

Ao contrário dos hormônios supracitados, a insulina é um hormônio anabólico, essencial para a manutenção da homeostase glicêmica. Esse hormônio é secretado pelas células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento da concentração plasmática de glicose e de aminoácidos, entre outros, após as refeições. A insulina aumenta a captação de glicose no músculo esquelético e no tecido adiposo (Randle *et al.*, 1963), através da translocação do transportador de glicose, GLUT4, e inibe a lipólise e aumenta a esterificação de ácidos graxos no tecido adiposo e músculo (Randle *et al.*, 1963). Desta forma, as ações anabólicas da insulina nos seus órgãos-alvos, promovem a síntese de glicogênio, de lipídios e de proteínas e inibem a lipólise e a glicogenólise (Saltiel & Kahn, 2001). No músculo esquelético, a glicose pode ser oxidada, utilizada na via glicolítica, ou armazenada na forma de glicogênio. No tecido adiposo, a insulina tem papel fundamental sobre a inibição da lipólise induzida pelas catecolaminas, e sobre o estímulo da lipogênese, através da estimulação das enzimas acetil-CoA carboxilase e ácido graxo sintetase (Saltiel & Kahn, 2001). No fígado, a insulina inibe a produção e a liberação de glicose através da inibição da glicogenólise e gliconeogênese (Pilkis & Granner, 1992) enquanto estimula a síntese de glicogênio e lipogênese (Sutherland *et al.*, 1996).

Os estudos realizados por (Reaven & Chen, 1988) têm demonstrado uma forte associação entre resistência insulínica, dislipidemia, obesidade visceral e hipertensão, caracterizando o que os pesquisadores denominam de síndrome metabólica, sendo que um dos pontos-chaves neste processo é a obesidade associada à resistência insulínica.

### 1.1.2 Regulação gênica do metabolismo intermediário

O controle do metabolismo lipídico e lipoprotéico, assim como a homeostase glicêmica, é um processo complexo que envolve a expressão coordenada de numerosos genes, cuja expressão pode ser regulada através de fatores de transcrição ativados por ligantes, denominados receptores nucleares (Chinetti *et al.*, 2001).

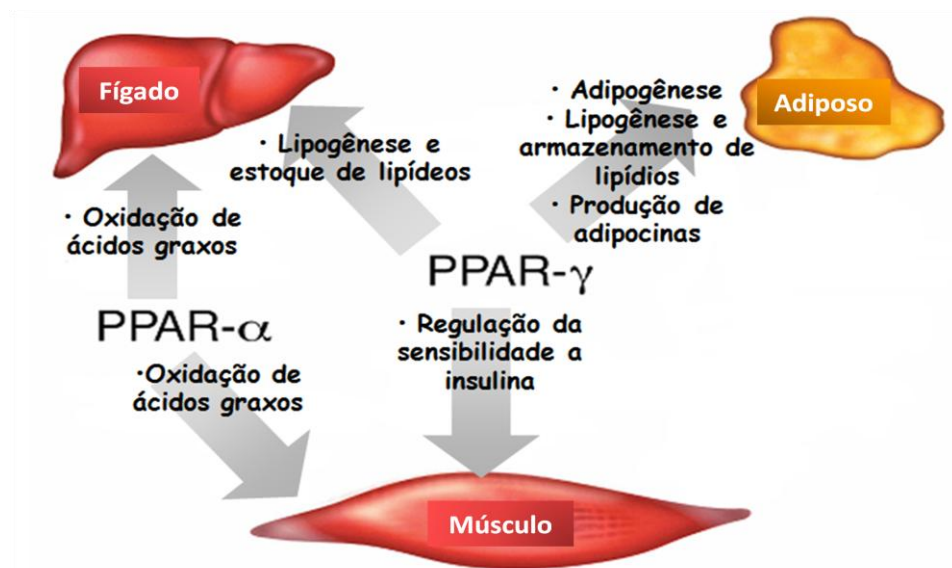
Os receptores nucleares ativados pelos proliferadores dos peroxissomos (PPARs) são fatores de transcrição pertencentes aos membros da superfamília de receptores nucleares. Os PPARs se dimerizam com o receptor retinóico X, e o complexo se liga aos elementos responsivos no DNA de genes alvos (Ernsberger & Koletsky, 2007).

Os PPARs existem sob três isoformas: PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta/\beta$  e o PPAR $\gamma$ . O PPAR $\alpha$  é expresso predominantemente em tecidos que apresentam altas taxas de oxidação de ácidos graxos, como o fígado, músculo esquelético, coração e rins (Kersten, 2002) e está relacionado com expressão gênica de proteínas envolvidas na  $\beta$ -oxidação peroxissomal como a acil CoA oxidase (ACO) e na  $\beta$ -oxidação mitocondrial como a carnitina-palmitoil transferase 1 (CPT-1), responsável pela transferência dos ácidos graxos para o interior da mitocôndria. O PPAR $\gamma$ , encontrado principalmente em adipócitos (Kersten, 2002), exerce um papel essencial sobre o processo de deposição lipídica, através do controle da expressão dos genes responsáveis pelo armazenamento de lipídios, como a acetil-CoA carboxilase (ACC), translocase de ácidos graxos (CD 36), proteína transportadora de ácidos graxos (FATP) (Kersten, 2002) e sobre o transportador de glicose dependente de insulina, GLUT 4 (Wu *et al.*, 1998). A ativação do PPAR $\gamma$  estimula tanto a adipogênese durante a fase de diferenciação celular, quanto a deposição lipídica na fase adulta, além de melhorar a sensibilidade a insulina (Sharma & Staels, 2007; DeFronzo, 2010). Já o PPAR $\delta/\beta$  pode ser expresso em vários tecidos como músculo esquelético, adiposo pulmão e em células, como macrófagos. Sua ativação promove um aumento no metabolismo de ácidos graxos e suprime a inflamação (Barish *et al.*, 2006). Por reduzir a expressão de mediadores inflamatórios e de moléculas de adesão, sua ativação tem papel importante na atenuação da aterogênese (Graham *et al.*, 2005; Tangirala *et al.*, 2008) Um resumo das ações dos PPARs é apresentado na figura 1.

Um dos fatores de transcrição importantes na regulação da biossíntese de ácidos graxos e de colesterol é a proteína de ligação ao elemento responsivo ao esterol (SREBP). As três isoformas: SREBP-1a, SREBP-1c e SREBP-2 são sintetizadas como precursores inativos e ficam ancoradas na membrana do retículo endoplasmático (Osborne &

Espenshade, 2009). A forma inativa é processada no complexo de Golgi e depois migram para o núcleo onde ativam a transcrição de genes alvo (Yokoyama *et al.*, 1993).

A isoforma SREBP-1a é encontrada em células proliferativas, enquanto a isoformas SREBP-1c é encontrada principalmente em hepatócitos. (Shimomura *et al.*, 1997). A ativação da isoforma SREBP-1c induz a expressão de enzimas chaves responsáveis pela síntese de ácidos graxos e de colesterol (Amemiya-Kudo *et al.*, 2002). O aumento da expressão de SREBP-1c no fígado pode contribuir para a esteatose hepática, dislipidemia (Jeon & Osborne, 2012) e resistência insulínica (Saltiel & Kahn, 2001).



**Figura 1:** Esquema das principais ações do PPAR $\alpha$  e PPAR $\gamma$  sobre os órgãos-alvos no controle do metabolismo intermediário Adaptado de Evans, 2004

### 1.1.3 Controle nutricional do metabolismo intermediário

Os lipídios contidos na dieta são transportados no plasma pelos quilomícra, enquanto que os lipídios de origem hepática são transportados pelas lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). Estas lipoproteínas caracterizam-se por apresentarem alto teor de triacilgliceróis, os quais são hidrolisados pela ação da enzima lipoproteína lipase (LPL), com a produção de ácidos graxos e glicerol (Karpe *et al.*, 1998) para serem utilizados pelos tecidos periféricos.

A lipoproteína lipase é sintetizada nas células parênquimais do tecido adiposo, músculos esquelético, cardíaco e glândula mamária e exportada para o sítio de ação nos capilares, onde se liga às cadeias de proteoglicanas na superfície luminal do endotélio

vascular (Karpe *et al.*, 1998). Estudos de (Botion, 2001) demonstraram que a atividade de LPL encontra-se diminuída no tecido adiposo de ratos Wistar após jejum de 24h, e que a atividade da enzima não é restaurada completamente após curtos períodos de realimentação.

O tecido adiposo branco contém a maior reserva de substrato energético de todo o corpo. Essa reserva está armazenada na forma de triacilglicerol (TAG). A esterificação de TAG é dependente do fornecimento de ácidos graxos, proveniente da hidrólise dos quilomicra e glicerol-3 fosfato (glicerol-3P). Há três fontes conhecidas de glicerol-3P: 1) através do fornecimento de diidroxiacetona pela via glicolítica; 2) intermediários de três carbonos (tais como piruvato e lactato) proveniente da via gliconeogênica; 3) glicerol diretamente fosforilado pela ação enzimática da gliceroquinase (Frasson *et al.*, 2012).

Os ácidos graxos re-esterificados a triacilglicerol e armazenado no tecido adiposo podem ser hidrolisados, em condições de demanda energética aumentada, pela ação da enzima lipase hormônio sensível (HSL), a qual é ativada pelas catecolaminas (Egan *et al.*, 1992). Por outro lado, tanto os ácidos graxos provenientes da lipólise no tecido adiposo quanto pela ação da LPL sobre as lipoproteínas circulantes podem ser oxidados ou armazenados em pequenas quantidades na forma de triacilgliceróis no músculo, dependendo da necessidade energética do tecido.

Os carboidratos presentes na dieta são hidrolizados predominantemente em glicose pelo trato gastrointestinal. Após a digestão, a glicose, através do sistema porta hepático é conduzida ao fígado, órgão primário na utilização da hexose. No fígado, a glicose pode ser oxidada, ser armazenada como glicogênio, ou então fornecer átomos de carbono para a síntese de lipídios e/ou proteínas. A síntese de lipídios provenientes de carbonos da glicose é regulada pelo fluxo na via glicolítica e também pela expressão de genes lipogênicos como a acetil-CoA carboxilase (ACC) e a ácido graxo-sintetase (FAS) (Foufelle & Ferre, 2002). A expressão de genes lipogênicos é dependente da ação da insulina e do SREBP-1c (Andreolas *et al.*, 2002), sendo o SREBP-1c o principal mediador da ação insulínica sobre a lipogênese hepática (Horton *et al.*, 2002).

Além de sua utilização hepática, a glicose entra na circulação sistêmica para então ser utilizada pelo sistema nervoso central bem como por outros tecidos periféricos. Como dito anteriormente, nos tecidos periféricos, principalmente músculo e tecido adiposo, a glicose é captada pela ação da insulina sobre a translocação de GLUT-4 das reservas citoplasmáticas para a membrana plasmática. O músculo esquelético constitui o principal

sítio de utilização de glicose estimulada pela insulina, onde a glicose pode ser oxidada, metabolizada na via glicolítica ou armazenada sob a forma de glicogênio muscular. Além disso, a captação de glicose pelo tecido adiposo é descrito como inibidor da liberação de ácidos graxos não-esterificados do tecido adiposo para corrente sanguínea e consequente utilização pelo músculo (Sugden, 2007). Embora o tecido adiposo tenha uma participação menor na utilização de glicose mediada pela insulina, os estudos de (Abel *et al.*, 2001) e de (Zisman *et al.*, 2000) demonstram que animais com deleção genética do GLUT 4, tanto no músculo como no tecido adiposo, apresentam intolerância à glicose, enquanto que a deleção sítio específica desse gene no tecido adiposo leva ao desenvolvimento de diabetes, mais severo quando comparado à deleção do GLUT4 especificamente no músculo. Esses dados sugerem uma função importante do tecido adiposo na regulação da captação de glicose e no desenvolvimento de resistência a insulina

### **1.2 Utilização da frutose como modelo de resistência insulínica.**

É bem estabelecido que a ingestão de dietas ricas em carboidratos simples pode aumentar o risco de desenvolvimento da resistência insulínica (Liu & Manson, 2001), e que a ingestão aumentada de frutose desencadeia uma seqüência de eventos que conduz à dislipidemia, resistência insulínica (Kasim-Karakas *et al.*, 1996) e hipertensão (Hwang *et al.*, 1987), semelhante aos encontrados no diabetes tipo 2.

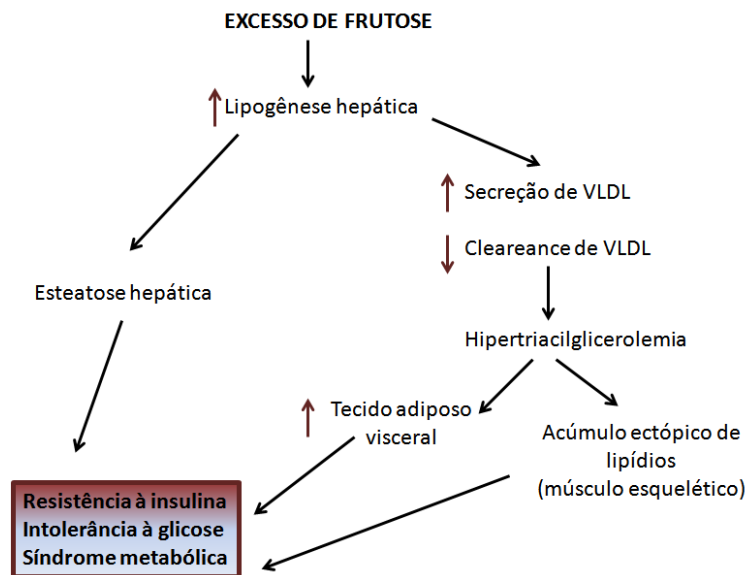
A frutose é um monossacarídeo prontamente absorvido no trato digestivo e rapidamente metabolizado pelo fígado. Estudos realizados com o emprego de traçadores radioativos mostram que 50% de toda a frutose ingerida é convertida à glicose, a qual pode ser armazenada como glicogênio hepático (>15%), ou liberada como glicose no plasma (Tappy & Le, 2010). Parte da frutose ingerida (25%) é convertida em lactato, o qual pode ser liberado na corrente sanguínea ou convertido em ácidos graxos, que após reesterificação em triacilgliceróis podem ser armazenados no fígado ou secretados na forma de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL-TAG) (Tappy & Le, 2010). A ingestão de pequenas quantidades de frutose pode ter efeitos positivos como: diminuição da glicemia em resposta a sobrecarga de glicose, melhora da tolerância à glicose, aumento na síntese de glicogênio e melhora na captação de hepática de glicose (Basciano *et al.*, 2005). Estes efeitos são observados sem nenhuma mudança nos níveis plasmáticos de insulina, ácidos graxos livres (AGLs) e triacilgliceróis (TAG) (Moore *et al.*, 2000). Entretanto, esses efeitos benéficos não persistem com a utilização crônica da frutose (McGuinness & Cherrington, 2003), uma vez que nestas condições são observadoa aumentos das concentrações plasmáticas de glicose, de triacilgliceróis e de ácidos graxos livres (Alzamendi *et al.*, 2009).



Além disso, a exposição do fígado a quantidades elevadas de frutose pode estimular a via lipogênica (síntese de gordura) e conseqüente acúmulo de TAG, podendo, desta forma, contribuir para uma redução na sensibilidade à insulina e intolerância hepática à glicose (Hallfrisch, 1990).

Estudos demonstraram que em ratos alimentados com 66% de frutose por duas semanas, a expressão do mRNA do receptor de insulina era menor no músculo esquelético e fígado quando comparado com o grupo controle que foi alimentado com dieta padrão (Catena *et al.*, 2003). Também houve aumento da pressão sangüínea e da concentração plasmática de TAG, mas não foram observadas variações no peso corporal e nos níveis plasmáticos de insulina e glicose. Em outro estudo foi encontrado que após 28 dias de tratamento com frutose não houve variação do número de receptores para insulina, porém, a autofosforilação do receptor, necessária para a sinalização da insulina, foi reduzida em 72% no fígado. O nível de proteína do substrato do receptor de insulina (IRS) foi semelhante, mas houve uma redução significativa da fosforilação do IRS tanto no fígado quanto no músculo esquelético de ratos alimentados com frutose (Ueno *et al.*, 2000). Estudos de “clamp” euglicêmico demonstraram que animais alimentados com frutose tiveram uma menor taxa de infusão e de clearance de glicose, associada a uma redução na fosforilação da proteína Akt (última molécula da via de sinalização da insulina) e menor translocação do GLUT 4 (Li *et al.*, 2008) no músculo esquelético.

A hipertriacilglicerolemia induzida por carboidratos é resultante da produção elevada e do clearance inadequado de TAG (Parks & Hellerstein, 2000). A esteatose hepática (acúmulo de TAG no fígado), originária da estimulação da via lipogênica está presente em modelos de animais alimentados com frutose (Koteish & Diehl, 2001). Animais mantidos cronicamente com dieta rica em frutose apresentam taxas elevadas de AGLs e hiperinsulinemia. O aumento do aporte de AGLs para o fígado promove a síntese hepática de TAG o qual é secretado na forma de lipoproteína de muita baixa densidade (VLDL) (Fried & Rao 2003). O excesso de secreção de VLDL aumenta o aporte dessa lipoproteína para o músculo fornecendo TAG e AG ao tecido, o que pode determinar resistência à insulina (Zammit *et al.*, 2001). Um resumo da ação da frutose na resistência insulínica está representado na figura 2.

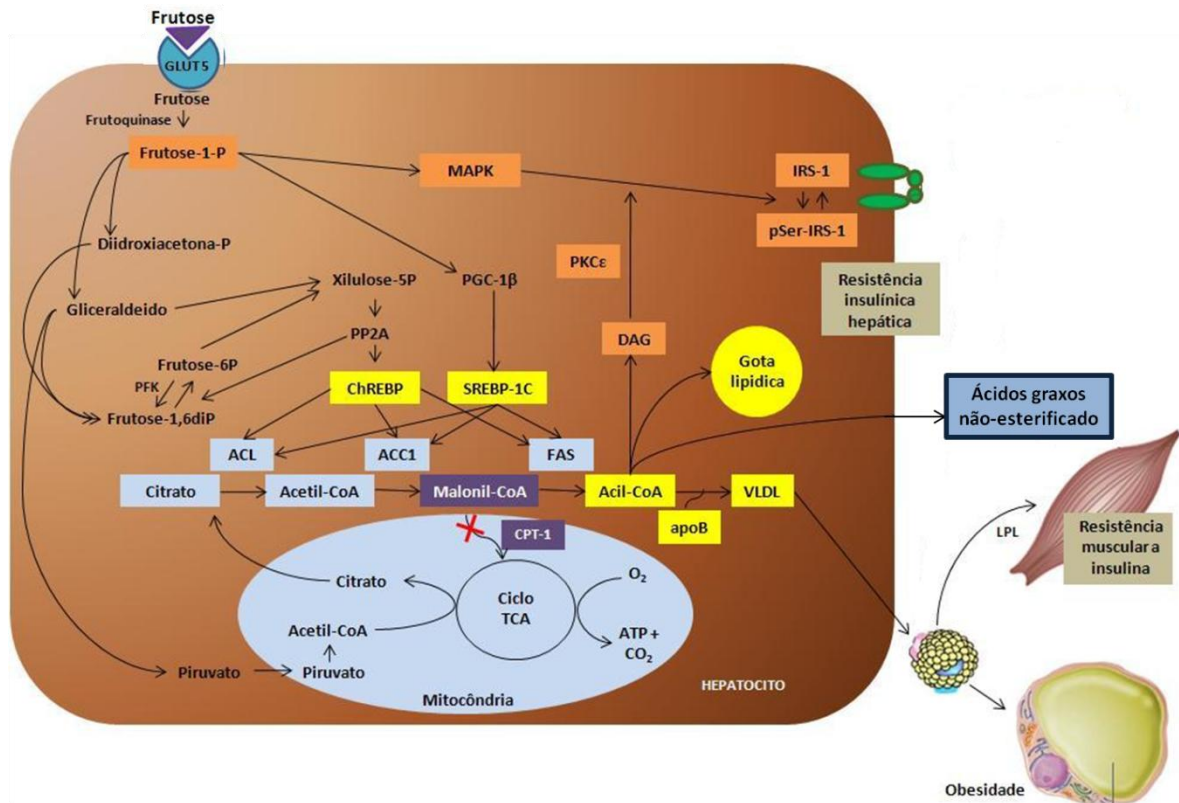


**Figura 2:** Esquema da ação de frutose no desenvolvimento da síndrome metabólica. Adaptado de (Tappy *et al.*, 2010).

Acredita-se que a grande capacidade do fígado em metabolizar altas quantidades de frutose seja responsável pela disfunção hepática no desenvolvimento do acúmulo lipídico. Após a absorção tanto de frutose quanto de glicose pelo intestino, ambas são disponibilizadas ao fígado através da veia porta. Entretanto, o metabolismo da frutose é distinto da glicose. No fígado a frutose é fosforilada a frutose-1 fosfato pela frutoquinase e diferentemente da glicoquinase, a fosforilação da frutose pela frutoquinase é específica e não é inibida alostericamente, pela frutose-1 fosfato. O papel chave da frutose na via glicolítica é que sua metabolização é desviada do passo limitante da via catalizado pela fosfofrutoquinase-1 (PFK-1), figura 3.

Assim, enquanto a utilização da glicose é regulada alostericamente ao nível da PFK-1 pela frutose 1,6 bisfosfato, e ao nível da glicoquinase pela glicose 6 fosfato, a frutose pode entrar continuamente na via glicolítica, ser fosforilada e posteriormente formar gliceraldeído-fosfato e dihidroxiacetona-fosfato os quais podem convergir para a via glicolítica e aumentar a disponibilidade de acil-CoA para a formação de cadeias de acil CoA graxo e subsequente esterificação em triacilgliceróis revisado em (Basciano *et al.*, 2005).

O consumo de dietas ricas em frutose é um fator de risco para o desenvolvimento de esteatose hepática não-alcóolica, promovendo aumento da fosfofrutoquinase (Ouyang *et al.*, 2008), ácido graxo sintetase (Miyazaki *et al.*, 2004; Ouyang *et al.*, 2008) e acetil-CoA carboxilase.



**Figura 3:** Ação da frutose no desenvolvimento do acúmulo lipídico hepático e sua contribuição para o desenvolvimento da resistência insulínica periférica. **ACC:** acetil-CoA carboxilase; **ACL:** ATP-citrato liase; **apoB:** apolipoproteína B100; **CPT-1:** carnitina palmitoil transferase-1; **ChREBP:** proteína de ligação ao elemento responsivo ao carboidrato; **DAG:** diacilglicerol; **FAS:** ácido graxo sintetase; **IRS-1:** substrato do receptor de insulina-1; **LPL:** lipoproteína lipase; **MAPK:** proteína quinase ativada por mitógeno; **PFK:** fosfofrutoquinase; **PGC-1 $\beta$ :** coativador 1 $\beta$  do receptor ativado pelo proliferador de peroxissomos gamma; **PKC $\xi$ :** proteína quinase C tipo  $\xi$ ; **PP2A:** proteína fosfatase 2A; **pSer-IRS-1:** substrato do receptor de insulina 1 fosforilado em serina; **SREBP-1c:** proteína de ligação ao elemento responsivo ao esterol; **VLDL:** lipoproteína de muito baixa densidade; **TCA:** ácido tricarbóxico. Adaptado de (Lim *et al.*, 2010).

Como dito anteriormente, a expressão de enzimas envolvidas na cascata de síntese lipogênica é regulada através da expressão de SREBP-1c. A expressão da SREBP-1c é aumentada pela insulina nos três principais tecidos responsivos a este hormônio, fígado, tecido adiposo e músculo (Foretz *et al.*, 1999; Guillet-Deniau *et al.*, 2002). Entretanto, foi verificado que quando animais diabéticos por injeção de estreptozotocina eram alimentados com glicose, frutose ou sacarose, havia indução deste fator de transcrição, sugerindo, assim, que a lipogênese pode ser estimulada mesmo na ausência de insulina (Matsuzaka *et al.*, 2004). Foi verificado que o aumento da expressão de SREBP-1c no fígado é encontrado em animais alimentados com frutose (Koo *et al.*, 2009).

Em suma, o alto consumo de frutose pode levar a um aumento da síntese de ácidos graxos e de sua esterificação a triacilgliceróis aumentando a deposição hepática de lipídio e conseqüentemente, aumento da secreção hepática de VLDL causando uma hipertrigliceridemia, e desenvolvimento de resistência insulínica no tecido adiposo e músculo.

### 1.3 Sistema renina-angiotensina

#### 1.3.1 Ações clássicas dos peptídeos angiotensinérgicos.

O sistema renina-angiotensina (SRA) tem ação primária no controle fisiológico do balanço hidroeletrolítico e da pressão arterial. Os principais componentes do SRA são o angiotensinogênio (globulina secretada pelo fígado), a renina (enzima liberada pelo aparelho justaglomerular renal), a enzima conversora de angiotensina (ECA) e a angiotensina II (Ang II). Na visão clássica, a renina é secretada pelos rins em resposta a uma baixa da pressão arterial e menor perfusão renal. A renina cliva o angiotensinogênio (AGT) em angiotensina I (um decapeptídeo inativo) a qual é clivada em ang-II pela ECA (figura 4). Esta enzima está presente na superfície vascular e tem como sua principal localização anatomorfofuncional o leito vascular pulmonar (Peach, 1977).

As ações da Ang II resultam da sua ligação aos receptores de angiotensinas dos tipos 1 e 2 (AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>), usualmente mediando efeitos opostos (Ernsberger & Koletsky, 2006) A identificação e caracterização dos receptores angiotensinérgicos ocorreu no final do século passado com o surgimento dos antagonistas da angiotensina II (PD123319 e losartan), quando, então, foi possível confirmar a existência de pelo menos 2 subtipos de receptores: AT<sub>1</sub>, sensível ao losartan e AT<sub>2</sub> sensível ao PD123319. Tanto os receptores AT<sub>1</sub> quanto AT<sub>2</sub> possuem sete domínios transmembrana formando alfa-hélices na bicamada lipídica e são acoplados à proteína G (Chiu *et al.*, 1989; Wong *et al.*, 1990; Wong *et al.*, 1990; Bumpus *et al.*, 1991; Bottari *et al.*, 1992). Os receptores AT<sub>1</sub> medeiam a maioria das ações fisiológicas clássicas da Ang II nos tecidos do sistema cardiovascular e neuroendócrino, onde apresentam expressiva distribuição (Shanmugam & Sandberg, 1996). É principalmente através das ações da Ang II mediadas pelo receptor AT<sub>1</sub> que o sistema renina-angiotensina influencia no controle da pressão arterial.

A ativação do receptor AT<sub>1</sub> no sistema circulatório leva a uma potente vasoconstrição (Timmermans *et al.*, 1993). Na zona glomerulosa da glândula adrenal a ativação do AT<sub>1</sub> promove liberação de aldosterona (Aguilera, 1992) que age no néfron promovendo a

reabsorção de sódio (Masilamani *et al.*, 1999). Os receptores AT1 no cérebro estão ligados a regulação do apetite de sal, sede e no controle da liberação de vasopressina (Davisson *et al.*, 2000; Morris *et al.*, 2002). Nos rins a ativação do AT1 leva a vasoconstrição renal (Ichikawa & Brenner 1980) e aumento na reabsorção tubular de sódio (Peti-Peterdi *et al.*, 2002).

Os receptores AT2 apesar de serem expressos em maior densidade no feto e período neonatal, parecem ter um papel fisiológico importante no adulto, mediando várias ações da Ang II (de Gasparo 2000; Gallinat *et al.*, 2000). Fisiologicamente, parece que o receptor AT2 age como um modulador de programas biológicos complexos como desenvolvimento embrionário, diferenciação celular, apoptose, regulação da função renal e pressão sanguínea (Carey *et al.*, 2000).

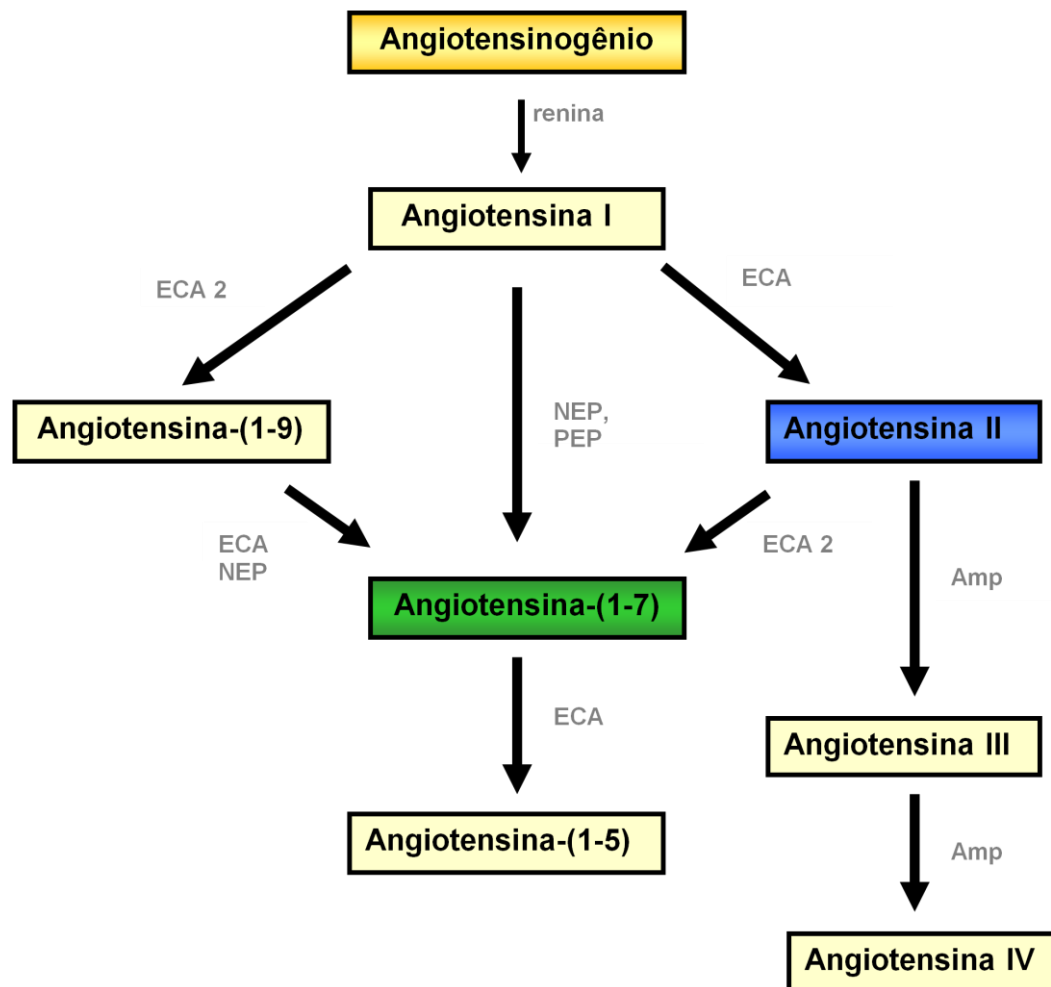
Um dos maiores efeitos da ativação do AT2 é ter ação de proteção contra a estimulação acentuada do AT1, por exemplo, a regressão da fibrose cardíaca e remodelação vascular evocado pelo AT2 se opõem aos efeitos fibróticos da Ang II mediados pelo AT1 (Wu *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2002) Tem sido relatado que os efeitos vasodilatadores da Ang II via AT2 se opõe ao efeito vasoconstrictor da Ang II via AT1 (Carey *et al.*, 2000), a ativação do AT2 parece ter efeito natriurético opondo-se ao efeito antinatriurético da ativação do AT1 (Siragy & Carey, 1999).

Tem sido proposto recentemente que, além do eixo ECA/angiotensina II/receptor AT, o SRA possui um eixo contra-regulador composto por ECA2/angiotensina-(1-7) /receptor Mas. A angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)) é um componente biologicamente ativo do SRA que se liga ao receptor Mas induzindo ações benéficas como vasodilatação, efeitos antifibróticos e antiproliferativos (Grobe *et al.*, 2007; Mercure *et al.*, 2008; Santiago *et al.*, 2010; Savergnini *et al.*, 2010).

O peptídeo angiotensina-(1-7) é produzido primariamente através da hidrólise de angiotensina II pela ação da ECA2 (Vickers *et al.*, 2002) (figura 4) mas também pode ser sintetizada a partir da angiotensina I pela da ação de endopeptidases e indiretamente e menor extensão pela ECA2 via angiotensina-(1-9) (Donoghue *et al.*, 2000).

Tem sido demonstrado que a Ang-(1-7) é um ligante endógeno para o receptor acoplado a proteína G, Mas (Santos *et al.*, 2003) O receptor Mas parece agir como antagonista funcional do receptor AT1 e a sinalização via receptor AT1 pode ser regulada de maneira tecido-específico pelos níveis de expressão do receptor Mas (Kostenis *et al.*,

2005). Os mecanismos de sinalização que medeiam às ações da angiotensina-(1-7) via receptor *Mas* não são totalmente elucidadas. A Ang-(1-7) é capaz de ativar a óxido nítrico sintase e assim apresentar um efeito vasodilatador através da liberação de óxido nítrico (Heitsch *et al.*, 2001) por uma via dependente da proteína Akt (Sampaio *et al.*, 2007) além de potencializar o efeito hipotensivo da bradicinina (Paula *et al.*, 1995; Abbas *et al.*, 1997) e promover hipotensão em animais SHR (Benter *et al.*, 1995).



**Figura 4.** Diagrama simplificado da cascata de formação e de degradação das principais angiotensinas. **Amp** aminopeptidase; **ECA** enzima conversora de angitensina; **ECA 2** enzima conversora de angiotensina 2; **NEP** endopeptidase neutra; **PEP** prolil-endopeptidase. Adaptado de (Ferreira *et al.*, 2012)

Estudos têm demonstrado que animais com deleção do receptor *Mas* apresentam ausências de diversos efeitos das ações da angiotensina-(1-7) como disfunção renal (Pinheiro *et al.*, 2009), perfil protrombótico (Fraga-Silva *et al.*, 2008) e alteração da sinalização de cálcio em cardiomiócitos (Dias-Peixoto *et al.*, 2008). Estes resultados

demonstram a importância do eixo ECA2/ Ang-(1-7)/ receptor Mas na homeostasia cardiovascular e na contra-regulação dos efeitos da angiotensina II via AT1.

### 1.3.2 Sistema renina angiotensina e metabolismo intermediário

Estudos recentes, apontam o sistema renina-angiotensina (SRA) não apenas como um controlador da pressão arterial e homeostasia cardiovascular, mas também como um complexo sistema hormonal envolvido em diversas funções fisiológicas.

Estudos recentes demonstram que componentes do SRA podem ser encontrados em tecidos como pâncreas (Chappell *et al.*, 1991; Lau *et al.*, 2004) e tecido adiposo (Cassis *et al.*, 1988; Engeli *et al.*, 2000) e pode afetar o metabolismo de glicose e lipídios através de vários mecanismos.

No pâncreas, a angiotensina II pode modular a secreção de insulina. Foi observado que, a vasoconstrição induzida pela Ang II em pâncreas de ratos (Carlsson *et al.*, 1998; Leung & Carlsson, 2005) e em ilhotas de pâncreas de humanos (Tahmasebi *et al.*, 1999; Ramracheya *et al.*, 2006), reduz o aporte de glicose nas ilhotas pancreáticas, impedindo a secreção de insulina, limitando a proliferação de células  $\beta$  e diminuindo a biossíntese de insulina, além de promover apoptose das células secretoras de insulina.

Vários estudos mostram que a Ang II promove hiperglicemia de maneira dose-dependente (Machado *et al.*, 1998), o qual pode ser atribuído a uma ação direta sobre a produção hepática de glicose através do aumento gliconeogênese (Coimbra *et al.*, 1999) e glicogenólise (Reinhart *et al.*, 1982). Esse efeito da Ang II é mediado por interação com o receptor AT1, uma vez que o bloqueio desse receptor pelo losartan promove inibição da produção hepática de glicose (Machado *et al.*, 1998; Hsieh, 2005).

Os adipócitos são a maior fonte do angiotensinogênio circulante (Engeli *et al.*, 2003) após o fígado, e a secreção desta proteína aumenta com a hipertrofia do tecido adiposo, podendo contribuir para a hipertensão em obesos. A angiotensina II atuando via receptor AT1 inibe a diferenciação de adipócitos (Janke *et al.*, 2002) e o bloqueio deste receptor previne o diabetes do tipo II por estimular a formação de células adiposas (Sharma *et al.*, 2002).

Tem sido relatado que a angiotensina II possui um *crosstalk* na via de sinalização da insulina promovendo resistência à insulina, uma vez que o aumento dos níveis plasmáticos

de angiotensina II está envolvido na diminuição da fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS-1) (Velloso *et al.*, 1996) enquanto aumenta a fosforilação em resíduos de serina do fosfatidil inositol 3 kinase (PI3K) (Folli *et al.*, 1997).

Estudos demonstram a importância da Ang-(1-7) na sinalização insulínica. A infusão crônica de angiotensina-(1-7) melhora a resistência insulínica induzida pela frutose (Giani *et al.*, 2009) através de uma maior fosforilação de substratos da cascata de sinalização da insulina, aumentando a atividade da Akt em tecidos extra-hepáticos, como músculo e tecido adiposo (Munoz *et al.*, 2010) sendo esses efeitos mediados pelo receptor Mas (Munoz *et al.*, 2012).

Estudos prévios demonstraram que a deleção do receptor Mas promove diminuição da captação de glicose no tecido adiposo, redução da expressão proteica do GLUT-4 e hiperinsulinemia (Santos *et al.*, 2008). Estudos recentes mostram que os camundongos com a deleção do receptor Mas apresentam aumento dos níveis ácidos graxos livres e menor atividade antilipolítica da insulina no tecido adiposo (Mario *et al.*, 2012). Além disso, observou-se menor expressão de PPAR $\gamma$  acompanhada de redução da expressão de suas enzimas alvos envolvidas na lipogênese como ACC e FAS no tecido adiposo (Mario *et al.*, 2012). Por outro lado o aumento dos níveis circulantes de angiotensina-(1-7) promove aumento da captação de glicose pelo tecido adiposo (Santos *et al.*, 2010).

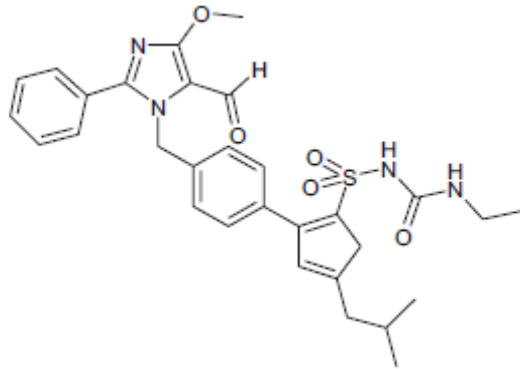
Além disso, animais com ausência do receptor Mas apresentam intolerância a glicose e menor sensibilidade à insulina (Santos *et al.*, 2008), enquanto que o aumento circulante de angiotensina-(1-7) promove uma melhora tanto na tolerância à glicose quanto na sensibilidade à insulina (Santos *et al.*, 2010). Juntos estes resultados mostram a importância da regulação pelo eixo angiotensina-(1-7)/receptor Mas sobre o metabolismo intermediário.

### **1.4 AVE 0991, primeiro análogo da angiotensina-(1-7).**

Tendo em vista a importância da Ang-(1-7) nas ações contra-reguladoras da Ang II e o seu papel no metabolismo lipídico e glicídico, o eixo Ang-(1-7)/receptor Mas pode ser um importante alvo para o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas. Um importante passo em direção a esse objetivo foi a descoberta do primeiro análogo da Ang-(1-7), AVE 0991 (AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND).



A substância 5-formil-4-metoxi-2-fenil-1[[4-[2-etilaminocarbonisulfonamida]-5-isobutil-3-tienil]fenil]-metil]-imidazol (AVE 0991; Figura 5), possui peso molecular de 580,73 e é solúvel em soluções aquosa alcalina ou solventes orgânicos (DMSO, etanol). A grande vantagem do AVE 0991 em relação a Ang-(1-7) é a sua resistência às enzimas do trato gastrointestinal, tornando-se então uma droga oralmente ativa. É um composto que mimetiza os efeitos da Ang-(1-7) em muitos tecidos (Santos & Ferreira, 2006).



**Figura 5:** Estrutura química do AVE 0991 (Adaptado de Santos e Ferreira, Hypertension, 2006).

O AVE 0991 evoca liberação de óxido nítrico/superóxido em células endoteliais de aorta bovina (Heitsch *et al.*, 2001), potencializa os efeitos da bradicinina (Carvalho *et al.*, 2007) e os efeitos de ambos foram parcialmente bloqueados pelo antagonista de Ang-(1-7), A-779 (Wiemer *et al.*, 2002).

O efeito do AVE0991 como agonista do receptor Mas foi demonstrado em rins onde animais com sobrecarga de água e tratados com angiotensina -(1-7) promoveu diminuição do volume e aumento da osmolaridade urinária sendo essas respostas bloqueadas pela ação do antagonista A 779 a ausência do receptor Mas ou o bloqueio com antagonista, A779 promoveu uma diminuição no volume e na osmolaridade urinária (Pinheiro *et al.*, 2004). O AVE0991 também tem ação renoprotetora na injúria renal (Barroso *et al.*, 2012) além de ação antiinflamatória em modelo de síndrome nefrótica (da Silveira *et al.*, 2010).

A ação cardioprotetora do AVE0991 foi similar àquela da Ang-(1-7), promovendo uma melhora na função contrátil pós-isquemia em coração isolado de ratos espontaneamente hipertensos tratados com L-NAME (Benter *et al.*, 2006), diminuição da área infartada induzida por ligação da artéria coronária esquerda (Ferreira *et al.*, 2007), atenuação do desenvolvimento da disfunção cardíaca induzida pelo diabetes (Benter *et al.*, 2007).

Pouco se sabe sobre a ação do AVE 0991 no metabolismo glicídico e lipídico. O tratamento com AVE0991 não altera os níveis de colesterol total e triacilglicerol (Toton-Zuranska *et al.*, 2010) em animais com arteriosclerose, entretanto, diminui o desenvolvimento da placa aterosclerótica (Jawien *et al.*, 2012).

Tendo em vista a importância do eixo ECA2/ angiotensina-(1-7)/ receptor Mas no metabolismo tanto lipídico como glicídico, na melhora da sensibilidade à insulina, é relevante compreender a ação de um agonista não-peptídico, ou seja, resistente a atividade enzimática e pH estomacal, nas alterações promovidas por modelo de resistência insulínica.

## 2. OBJETIVOS

Investigar a ação AVE 0991 nas alterações metabólicas promovidas pela suplementação com frutose.

### 2.1 Objetivos específicos

- Verificar se o tratamento com AVE 0991 altera os parâmetros morfométricos promovidos pela frutose, através da avaliação da evolução do peso corporal e biometria dos tecidos hepáticos e adiposo.

- Avaliar o perfil lipídico através da análise sérica de colesterol total, triacilglicerol, ácidos graxos livres e glicídico através de teste oral de tolerância a glicose e teste de sensibilidade a insulina, além da concentração sérica de lactato e insulina.

- Estudar a ação do AVE0991 sobre as alterações hepáticas promovidas pela frutose, pela avaliação de glicogênio, lipídios totais e taxa de secreção de VLDL-TAG. Além de analisar genes envolvidos, tanto na deposição quanto na oxidação lipídica.

- Verificar o metabolismo lipídico do músculo através da medida da atividade da LPL, conteúdo de lipídios totais e triacilgliceróis, além de estudar genes envolvidos na deposição e oxidação de lipídios.

- Estudar a disponibilidade lipídica para o tecido adiposo, através da atividade da LPL e expressão de genes envolvidos na deposição de gordura.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Animais e seu tratamento

Foram utilizados ratos machos Sprague-Dawley pesando  $350 \pm 10$ g provenientes do biotério do laboratório de hipertensão do Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB, UFMG. Todos os animais foram mantidos em ambiente com controle de luz (14 horas luz) e temperatura ( $23 \pm 3^\circ\text{C}$ ). Os procedimentos de manuseio e experimentais estão de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG), número do protocolo 38/2009.

Após três dias de aclimatação os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: **grupo controle (C)** que receberam dieta padrão e **grupo frutose (F)** que receberam dieta padrão e solução de frutose a 10% (preparada a cada dois dias) na água de beber, durante cinco semanas. O grupo controle recebeu água *ad libitum* enquanto o grupo frutose não teve acesso à água pura durante todo o período experimental. Nas duas últimas semanas do período experimental os grupos controle e frutose foram subdivididos em **grupo controle + AVE (CA)** e **grupo frutose + AVE (FA)** que receberam por gavagem uma solução de AVE 0991 na dose de 1mg/Kg de peso corporal uma vez ao dia durante duas semanas. A dose de AVE 0991 foi escolhida baseado em estudos anteriores de (Ferreira *et al.*, 2007). Os grupos controle e frutose receberam salina durante o mesmo período. A evolução ponderal foi avaliada ao longo do período experimental, quando os animais eram pesados uma vez por semana. Ao final do período experimental os animais foram eutanaziados, em estado alimentado, e o plasma e tecidos foram retirados para análises subsequentes.

### 3.2 Metodologias

#### 3.2.1 Teste oral de tolerância à glicose e teste de sensibilidade à insulina

Para o teste oral de tolerância a glicose, ao final do tratamento, todos os animais foram submetidos ao jejum de 12 horas, sendo que os grupos F e FA foram também privados da solução de frutose. Após o período de jejum os animais receberam por gavagem uma solução saturada de glicose (2g / Kg de peso corporal) e a glicemia foi avaliada nos seguintes intervalos de tempo: 0 (refere-se ao tempo antes da gavagem de glicose), 15, 30, 60 e 90 minutos após a administração de glicose. Para o teste de sensibilidade insulínica os animais, no estado alimentado, receberam injeção intraperitoneal de 0,75UI insulina/Kg de

peso corporal, e a glicemia foi avaliada nos tempos 0 (imediatamente antes da injeção ip de insulina), 15, 30, 60 e 90 minutos após a administração de insulina. O sangue utilizado para a medida das glicemias nos respectivos testes foi obtido através de uma pequena incisão na cauda do animal e foi utilizado o glicosímetro Accu-Chek® Advantage (Roche, EUA) com tal finalidade.

### 3.2.2 Perfil plasmático

A concentração sérica de ácidos graxos não-esterificados (AGNE) foi avaliada pela utilização de kit comercial (WAKO, Pure Chemical Industries, Japan). Os triacilgliceróis, colesterol total e lactato foram quantificados através de kit enzimático (LABTEST, Lagoa Santa, MG) seguindo as recomendações fornecidas pelo fabricante. A concentração sérica de insulina foi avaliada por ELISA (Millipore®, EUA), de acordo com as especificações do fabricante.

### 3.2.3 Determinação do conteúdo hepático de glicogênio.

O conteúdo de glicogênio hepático (mg/g de tecido) foi determinado pelo método de Hassid & Abraham (1957). Amostra de tecido foram inicialmente digerida em solução de KOH 30% durante 1h em banho-maria fervente. Em seguida, a reação do KOH foi parada adicionando solução saturada de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, o glicogênio extraído foi lavado e precipitado com álcool 70%. Na sequência a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 2000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em água destilada. Uma alíquota da amostra foi utilizada para a hidrólise do glicogênio em banho-maria fervente com solução de antrona em ácido sulfúrico, responsável pela hidrólise do glicogênio produzindo assim glicose. A antrona reage com a glicose formando uma cor esverdeada que foi determinada por espectrofotometria no comprimento de onda de 620 nm. Diferentes concentrações de glicose foi utilizada para calibrar a curva.

### 3.2.4 Determinação do conteúdo de lipídios totais e triacilglicerol

Porções de tecidos hepáticos e muscular foram homogeneizadas em clorofórmio:metanol 2:1 e deixadas extrair por cerca de 16h. Após filtração, adicionou-se solução fisiológica 0,9% na proporção de 2 ml para 10 ml de filtrado. Após separação das fases, uma alíquota da fase clorofórmica foi transferida para frascos previamente pesados, e os lipídios totais foram quantificados por gravimetria (Folch *et al.*, 1957). Após a gravimetria, os lipídeos extraídos foram ressuspensionados em isopropanol e uma alíquota foi

usada para a mensuração de triacilglicerol hepático através de kit enzimático (LABTEST, Lagoa Santa, MG).

### **3.2.5 Análise histológica do fígado em microscopia de luz**

#### **3.2.5.1 Processamento do material para análise em microscopia de luz**

Fragmentos de fígado com aproximadamente 1 mm de espessura foram removidos e processados conforme o padrão de técnicas histológicas. Assim, os fragmentos foram imersos em solução fixadora de glutaraldeído a 4,5%, em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3, por um período de 24 horas. Em seguida, procederam-se às etapas de desidratação em série crescente de álcoois (70°, 85°, 90°, 95° e 100°) e a inclusão em parafina. Foram obtidas secções histológicas com 3 µm de espessura e as mesmas foram coradas com hematoxilina e eosina, e analisadas ao microscópio de luz Olympus BX-40.

#### **3.2.5.2 Análise histológica dos hepatócitos**

Afim de analisar se a suplementação com frutose promove alteração nas características morfológicas dos hepatócitos e se o tratamento com AVE 0991 influenciaria nessas alterações foram investigados os fragmentos histológicos de 8 animais por grupo.

Para quantificar as alterações observadas na morfologia dos hepatócitos foram realizadas as análises morfométricas, que inclui a proporção volumétrica e a medida dos diâmetros nucleares, em varredura horizontal abrangendo toda a extensão da secção histológica.

##### **3.2.5.2.1 Medida dos diâmetros nucleares**

Considerando-se que os núcleos de hepatócitos apresentavam-se esféricos e com limites precisos, os mesmos foram utilizados como referência para cálculo do volume celular, como será descrito adiante. O diâmetro nuclear médio dos hepatócitos foi obtido a partir da mensuração de 30 núcleos por campo, por animal, escolhidos aleatoriamente porém que representassem a secção transversal mais próxima o possível do diâmetro real

do núcleo. Para isto utilizou-se uma régua micrométrica acoplada à ocular de 10x, em aumento final de 1000x.

### 3.2.5.2.2 Proporção volumétrica

As proporções volumétricas de núcleo e citoplasma dos hepatócitos e a proporção de lipídios nestas células foram estimadas utilizando-se retículo com 441 intersecções (pontos), em aumento de 1000x. Para cada animal foram analisados aproximadamente 1000 pontos sobre hepatócitos obtendo-se a proporção entre núcleo/citoplasma, em porcentagem.

### 3.2.5.2.3 Volume celular

Para obtenção do volume médio dos hepatócitos de cada animal, avaliou-se o volume nuclear, empregando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Volume Nuclear} = 4/3 \pi \cdot R^3$$

onde, R = diâmetro nuclear/2, expresso em  $\mu\text{m}$ . O volume nuclear é expresso em  $\mu\text{m}^3$ .

A partir do volume do núcleo e a proporção de núcleo e de citoplasma calcula-se o volume citoplasmático, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Volume citoplasmático} = \% \text{ do citoplasma} \times \text{volume nuclear} / \% \text{ de núcleo}$$

O volume celular corresponde ao volume citoplasmático + o volume nuclear.

### 3.2.5.2.4 Volume ocupado pelas gotículas lipídicas

A partir do volume celular e da proporção (%) de lipídios presentes nos hepatócitos, calculou-se o volume ocupado pelas gotículas lipídicas.

### 3.2.6 Avaliação da secreção hepática de VLDL-TAG.

A injeção intravenosa de detergente não-iônico tyloxapol (Triton WR-1339, Sigma-Aldrich, USA) em animais experimentais leva ao acúmulo plasmático de triacilglicerol devido a incapacidade da enzima lipase lipoproteica (LPL) extrahepática em hidrolisar os triacilgliceróis dos animais tratados com tyloxapol. Para avaliarmos a secreção hepática de

VLDL os animais foram deixados em jejum por 12h e após esse período receberam injeção intravenosa de uma solução a 20% de tyloxapol em 0,9% de NaCl (v/v) na dose de 400mg/Kg de peso corporal. Após duas horas da injeção do detergente, o plasma foi obtido e a secreção de VLDL foi estimada pela medida da concentração plasmática de triacilgliceróis acumulados no período modificado de (Borensztajn *et al.*, 1976).

### **3.2.7 Quantificação da expressão do RNAm por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR)**

#### **3.2.7.1 Extração do RNA total**

Os fragmentos de tecidos hepático, muscular e tecido adiposo epididimal foram homogeneizados em tubos de plástico com o reagente Tri-Phasis<sup>®</sup> (BioAgency, Brasil) na proporção de 0,1 g de tecido/1,0 mL do reagente conforme protocolo do fabricante. Os recipientes contendo o homogenado foram incubados á temperatura ambiente por 10 minutos, e em seguida 0,2 mL de clorofórmio foram adicionados. Os tubos foram agitados vigorosamente e deixados em repouso por 5 minutos a 4 °C, sendo, em seguida, centrifugados a 12.000 rpm durante 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para microtubos, com subseqüente adição de 0,5 mL de isopropanol. A mistura foi levemente agitada e mantida em repouso a 4°C por 10 minutos. Nova precipitação foi realizada a 12.000rpm/10min/ 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado resultante foi ressuspenso em 1 mL de etanol gelado 70 % (solução manufaturada em água tratada com dietil-pirocarbonato – DEPC), e a mistura foi novamente agitada. Após centrifugação, o sobrenadante foi vertido e mantidos em temperatura ambiente até a evaporação do solvente. O RNA foi novamente ressuspenso em 0,05 mL de água DEPC.

#### **3.2.7.2 Eliminação de moléculas de DNA genômico de amostra de RNA total.**

Para eliminação de uma possível contaminação com DNA genômico nas amostras de RNA total, utilizou-se a enzima desoxiribonuclease I (GibcoBRL<sup>®</sup>) e o tratamento foi feito de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

#### **3.2.7.3 Quantificação do RNA total e transcrição reversa**

O RNA total foi utilizado para a síntese de DNA complementar (DNAc). Resumidamente, a 1 µg de RNA total foram adicionados: 0,2 µg de hexadeodinucleotídeos e tampão para transcrição reversa (Tris-HCl 45mM pH 8,5; MgCl<sub>2</sub> 50mM; DTT 15mM;



dNTPs 1,8 mM e 150 UI de transcriptase reversa) obtidos da empresa Fermentas® (Canadá). O DNAc foi sintetizado em termociclizador durante um período de 60 minutos de incubação a 37°C, e a reação foi interrompida pelo aquecimento a 90 °C por 5 minutos. O DNAc foi armazenado à – 20°C.

### 3.2.7.4 PCR Semi – Quantitativo

As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) dos genes alvos para reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-TR) foram selecionados através do programa BLASTn do National Center for Biotechnology Information-(NCBI) e foram sintetizadas pela empresa Invitrogen® (tabela 1). O gene S26 foi utilizado como normalizador.

O DNAc obtido da etapa de RT (2 µl ) foi utilizado como fita molde para a amplificação por PCR. As reações de PCR tiveram volume final de 25 µl e foram feitas em duplicatas, utilizando 19 µl do master mix de SYBR Green (Applied Biosystem), e 2 µl de cada *primer* (senso e anti-senso) na concentração de 1 nm/µl e 2 µl de DNAc. O aparelho para reação foi o ABI Prism 7000 (Applied Biosystem, USA), sendo realizados 40 ciclos em temperatura de anelamento de 60 °C.

A análise da expressão dos genes foi semi-quantitativa (método delta delta CT) segundo modelo matemático desenvolvido por (Pfaffl 2001). O valor de CT (*threshold cycle*) representa o momento da reação de PCR em que a fluorescência de determinada amostra é detectada acima do ruído de fundo (*background*). O resultado foi expresso em unidades arbitrárias. O modelo matemático utilizado para obtenção das unidades arbitrárias para essa análise foi:

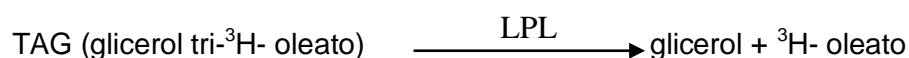
- 1- Subtração do valor de CT dos genes estudados pelo CT do S26 ( $\Delta CT$ );
- 2 - média do  $\Delta CT$  das amostras;
- 3 -  $\Delta CT$  de cada amostra – a média do  $\Delta CT$  ( $\Delta\Delta CT$ );
- 4 - potenciação negativa do  $\Delta\Delta CT$  na base 2 =  $2^{-\Delta\Delta CT}$

**Tabela1:** Primers para PCR em tempo real

Gene	Primer	Sequência de nucleotídeos
S26	Senso	5'-CGA TTC CTG ACA ACC TTG CTA-3'
	Antisenso	5'-CGT GCT TCC CAA GCT CTA TGT-3'
PPAR $\gamma$	Senso	5'- AGA TCA TCT ACA CCA TGCTGG CCT-3'
	Antisenso	5'-AGG AAC TCCCTG GTC ATG AAT CCT-3'
SREBP-1c	Senso	5'-GCC CAC AAT GCC ATT GAG A-3'
	Antisenso	5'-GCA GAT TTA TTC AGC TTT GCT TCA-3'
PPAR $\alpha$	Senso	5'-TAC CAC TAT GGA GTC CAC GCA TGT-3'
	Antisenso	5'-TTG CAG CTT CGA TCA CAC TTG TCG-3'
CPT-1	Senso	5'-ACG TGA GTG ACT GGT GGG AAG AAT-3'
	Antisenso	5'- TCT CCA TGG CGT AGT AGT TGC TGT-3'
ACO	Senso	5'- ATC TCT GTG GTT GCT GTG GAG TCA-3'
	Antisenso	5'-TCT GGA TGC TTC CTT CTC CAA GGT-5'

### 3.2.8 Medida da atividade da lipase lipoprotéica (LPL)

A lipase lipoprotéica (LPL) é uma glicoproteína, cujas características funcionais mais importantes são: possuir um pH ótimo de ação alcalino (8,0 – 8,5), ser inibida por NaCl 1M e requerer um cofator específico para manifestar sua atividade, a apolipoproteína C-II. O ensaio da atividade enzimática da LPL baseia-se no método de (Nilsson-Ehle & Schotz 1976) e fundamenta-se na reação:



Os ácidos graxos liberados ( $^3\text{H- oleato}$ ) foram separados pela utilização de um sistema de partição líquido-líquido e uma alíquota dos AGL situados na fase superior polar, foi removida para a determinação da radioatividade correspondente. O índice de hidrólise é diretamente proporcional à atividade da enzima.

Para a medida da atividade da LPL, fragmentos do tecido adiposo epididimal foram homogeneizados em tampão Tris-HCL (pH 8,3) contendo detergentes, centrifugados a 2500 rpm por 15 minutos e a camada intermediária, abaixo da camada gordurosa, foi

utilizada para a medida da atividade enzimática. A emulsão-substrato foi preparada por sonicação a 4 °C durante 5 min com trioleína fria e [9,10-<sup>3</sup>H]trioleato e estabilizada com lecitina. Esta emulsão é estável por cerca 2 meses no escuro.

No dia do experimento foi preparada a mistura de reação, contendo 2 partes de tampão LPL (Tris 0,2M, pH 8,3; contendo 6 % de albumina bovina livre de ácidos graxos e cloreto de sódio 0,15M), 2 partes de emulsão-substrato e 1 parte de soro de rato em jejum por 24 horas como fonte de Apo-CII. A mistura de reação foi agitada em vortex e 100 µL adicionados em todos os tubos. A reação iniciou-se pela adição de 10 µL do homogenado que foi então incubado sob agitação por 45 minutos a 37°C. Ao final do período de incubação adicionou-se inicialmente 3,25 mL da mistura de extração clorofórmio-heptanametanol, 1,25:1,1:1,41 (Belfrage & Vaughan 1969) e em seguida 1,05 ml de tampão carbonato-borato 0,1M pH 10,5, sob agitação em vortex. Os tubos de ensaio foram centrifugados à temperatura ambiente por 10 minutos e uma alíquota de 1,0 mL da fase aquosa superior foi colocada em 4 ml de coquetel de cintilação (tolueno-triton-PPO-POPOP) e a radioatividade quantificada por espectroscopia de cintilação líquida.

### **3.3 Análise dos dados**

Para a análise dos dados foi utilizada a análise de variância de duas vias (Two-way ANOVA), seguida do teste de comparação Bonferroni. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ . Os cálculos e análises estatísticas foram realizados utilizando-se o programa Graph Pad Prism 5.0 (San Diego, CA, USA).

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A., Gorelik, G., Carbini, L. A. and Scicli, A. G. (1997). "Angiotensin-(1-7) induces bradykinin-mediated hypotensive responses in anesthetized rats." *Hypertension* **30**(2 Pt 1): 217-221.
- Abel, E. D., Peroni, O., Kim, J. K., Kim, Y. B., Boss, O., Hadro, E., Minnemann, T., Shulman, G. I. and Kahn, B. B. (2001). "Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver." *Nature* **409**(6821): 729-733.
- Aguilera, G. (1992). "Role of angiotensin II receptor subtypes on the regulation of aldosterone secretion in the adrenal glomerulosa zone in the rat." *Mol Cell Endocrinol* **90**(1): 53-60.
- Alzamendi, A., Giovambattista, A., Raschia, A., Madrid, V., Gaillard, R. C., Rebolledo, O., Gagliardino, J. J. and Spinedi, E. (2009). "Fructose-rich diet-induced abdominal adipose tissue endocrine dysfunction in normal male rats." *Endocrine* **35**(2): 227-232.
- Amemiya-Kudo, M., Shimano, H., Hasty, A. H., Yahagi, N., Yoshikawa, T., Matsuzaka, T., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., Osuga, J., Harada, K., Gotoda, T., Sato, R., Kimura, S., Ishibashi, S. and Yamada, N. (2002). "Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes." *J Lipid Res* **43**(8): 1220-1235.
- Andreolas, C., da Silva Xavier, G., Diraison, F., Zhao, C., Varadi, A., Lopez-Casillas, F., Ferre, P., Fougere, F. and Rutter, G. A. (2002). "Stimulation of acetyl-CoA carboxylase gene expression by glucose requires insulin release and sterol regulatory element binding protein 1c in pancreatic MIN6 beta-cells." *Diabetes* **51**(8): 2536-2545.
- Barish, G. D., Narkar, V. A. and Evans, R. M. (2006). "PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome." *J Clin Invest* **116**(3): 590-597.
- Barroso, L. C., Silveira, K. D., Lima, C. X., Borges, V., Bader, M., Rachid, M., Santos, R. A., Souza, D. G., Simoes, E. S. A. C. and Teixeira, M. M. (2012). "Renoprotective Effects of AVE0991, a Nonpeptide Mas Receptor Agonist, in Experimental Acute Renal Injury." *Int J Hypertens* **2012**: 808726.
- Basciano, H., Federico, L. and Adeli, K. (2005). "Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia." *Nutr Metab (Lond)* **2**(1): 5.
- Belfrage, P. and Vaughan, M. (1969). "Simple liquid-liquid partition system for isolation of labeled oleic acid from mixtures with glycerides." *J Lipid Res* **10**(3): 341-344.
- Benter, I. F., Ferrario, C. M., Morris, M. and Diz, D. I. (1995). "Antihypertensive actions of angiotensin-(1-7) in spontaneously hypertensive rats." *Am J Physiol* **269**(1 Pt 2): H313-319.
- Benter, I. F., Yousif, M. H., Anim, J. T., Cojocel, C. and Diz, D. I. (2006). "Angiotensin-(1-7) prevents development of severe hypertension and end-organ damage in spontaneously hypertensive rats treated with L-NAME." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**(2): H684-691.
- Benter, I. F., Yousif, M. H., Cojocel, C., Al-Maghrebi, M. and Diz, D. I. (2007). "Angiotensin-(1-7) prevents diabetes-induced cardiovascular dysfunction." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**(1): H666-672.

## Referências Bibliográficas

- Borensztajn, J., Rone, M. S. and Kotlar, T. J. (1976). "The inhibition in vivo of lipoprotein lipase (clearing-factor lipase) activity by triton WR-1339." Biochem J **156**(3): 539-543.
- Botion, L. M. (2001). "The influence of fasting/refeeding on the lipoprotein lipase activity of adipose tissue and muscle." Braz J Med Biol Res **34**(11): 1411-1414.
- Bottari, S. P., King, I. N., Reichlin, S., Dahlstroem, I., Lydon, N. and de Gasparo, M. (1992). "The angiotensin AT2 receptor stimulates protein tyrosine phosphatase activity and mediates inhibition of particulate guanylate cyclase." Biochemical and biophysical research communications **183**(1): 206-211.
- Bumpus, F. M., Catt, K. J., Chiu, A. T., DeGasparo, M., Goodfriend, T., Husain, A., Peach, M. J., Taylor, D. G., Jr. and Timmermans, P. B. (1991). "Nomenclature for angiotensin receptors. A report of the Nomenclature Committee of the Council for High Blood Pressure Research." Hypertension **17**(5): 720-721.
- Carey, R. M., Wang, Z. Q. and Siragy, H. M. (2000). "Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function." Hypertension **35**(1 Pt 2): 155-163.
- Carlsson, P. O., Berne, C. and Jansson, L. (1998). "Angiotensin II and the endocrine pancreas: effects on islet blood flow and insulin secretion in rats." Diabetologia **41**(2): 127-133.
- Carmona, A. and Freedland, R. A. (1989). "Comparison among the lipogenic potential of various substrates in rat hepatocytes: the differential effects of fructose-containing diets on hepatic lipogenesis." J Nutr **119**(9): 1304-1310.
- Carvalho, M. B., Duarte, F. V., Faria-Silva, R., Fauler, B., da Mata Machado, L. T., de Paula, R. D., Campagnole-Santos, M. J. and Santos, R. A. (2007). "Evidence for Mas-mediated bradykinin potentiation by the angiotensin-(1-7) nonpeptide mimic AVE 0991 in normotensive rats." Hypertension **50**(4): 762-767.
- Cassis, L. A., Saye, J. and Peach, M. J. (1988). "Location and regulation of rat angiotensinogen messenger RNA." Hypertension **11**(6 Pt 2): 591-596.
- Catena, C., Giacchetti, G., Novello, M., Colussi, G., Cavarape, A. and Sechi, L. A. (2003). "Cellular mechanisms of insulin resistance in rats with fructose-induced hypertension." American Journal of Hypertension **16**(11 Pt 1): 973-978.
- Chappell, M. C., Millsted, A., Diz, D. I., Brosnihan, K. B. and Ferrario, C. M. (1991). "Evidence for an intrinsic angiotensin system in the canine pancreas." Journal of Hypertension **9**(8): 751-759.
- Chinetti, G., Lestavel, S., Bocher, V., Remaley, A. T., Neve, B., Torra, I. P., Teissier, E., Minnich, A., Jaye, M., Duverger, N., Brewer, H. B., Fruchart, J. C., Clavey, V. and Staels, B. (2001). "PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway." Nat Med **7**(1): 53-58.
- Chiu, A. T., Herblin, W. F., McCall, D. E., Ardecky, R. J., Carini, D. J., Duncia, J. V., Pease, L. J., Wong, P. C., Wexler, R. R., Johnson, A. L. and et al. (1989). "Identification of angiotensin II receptor subtypes." Biochem Biophys Res Commun **165**(1): 196-203.
- Choi, S. H. and Ginsberg, H. N. (2011). "Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance." Trends Endocrinol Metab **22**(9): 353-363.

## Referências Bibliográficas

- Coelho, M. S., Lopes, K. L., Freitas Rde, A., de Oliveira-Sales, E. B., Bergasmaschi, C. T., Campos, R. R., Casarini, D. E., Carmona, A. K., Araujo Mda, S., Heimann, J. C. and Dolnikoff, M. S. (2010). "High sucrose intake in rats is associated with increased ACE2 and angiotensin-(1-7) levels in the adipose tissue." Regul Pept **162**(1-3): 61-67.
- Cohn, J. S., Patterson, B. W., Uffelman, K. D., Davignon, J. and Steiner, G. (2004). "Rate of production of plasma and very-low-density lipoprotein (VLDL) apolipoprotein C-III is strongly related to the concentration and level of production of VLDL triglyceride in male subjects with different body weights and levels of insulin sensitivity." J Clin Endocrinol Metab **89**(8): 3949-3955.
- Coimbra, C. C., Garofalo, M. A., Foscolo, D. R., Xavier, A. R. and Migliorini, R. H. (1999). "Gluconeogenesis activation after intravenous angiotensin II in freely moving rats." Peptides **20**(7): 823-827.
- da Silveira, K. D., Coelho, F. M., Vieira, A. T., Sachs, D., Barroso, L. C., Costa, V. V., Bretas, T. L., Bader, M., de Sousa, L. P., da Silva, T. A., dos Santos, R. A., Simoes e Silva, A. C. and Teixeira, M. M. (2010). "Anti-inflammatory effects of the activation of the angiotensin-(1-7) receptor, MAS, in experimental models of arthritis." J Immunol **185**(9): 5569-5576.
- Davisson, R. L., Oliverio, M. I., Coffman, T. M. and Sigmund, C. D. (2000). "Divergent functions of angiotensin II receptor isoforms in the brain." J Clin Invest **106**(1): 103-106.
- de Gasparo, M. (2000). "New basic science initiatives with the angiotensin II receptor blocker valsartan." Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS **1**(2 Suppl): S3-5.
- DeFronzo, R. A. (1997). "Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis." Neth J Med **50**(5): 191-197.
- DeFronzo, R. A. (2010). "Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009." Diabetologia **53**(7): 1270-1287.
- Dias-Peixoto, M. F., Santos, R. A., Gomes, E. R., Alves, M. N., Almeida, P. W., Greco, L., Rosa, M., Fauler, B., Bader, M., Alenina, N. and Guatimosim, S. (2008). "Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes." Hypertension **52**(3): 542-548.
- Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., Breitbart, R. E. and Acton, S. (2000). "A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9." Circ Res **87**(5): E1-9.
- Eckel, R. H., Grundy, S. M. and Zimmet, P. Z. (2005). "The metabolic syndrome." Lancet **365**(9468): 1415-1428.
- Egan, J. J., Greenberg, A. S., Chang, M. K., Wek, S. A., Moos, M. C., Jr. and Londos, C. (1992). "Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(18): 8537-8541.
- Engeli, S., Negrel, R. and Sharma, A. M. (2000). "Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system." Hypertension **35**(6): 1270-1277.
- Engeli, S., Schling, P., Gorzelniak, K., Boschmann, M., Janke, J., Ailhaud, G., Teboul, M., Massiera, F. and Sharma, A. M. (2003). "The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome?" Int J Biochem Cell Biol **35**(6): 807-825.

## Referências Bibliográficas

- Ernsberger, P. and Koletsky, R. J. (2006). "Metabolic effects of antihypertensive agents: role of sympathoadrenal and renin-angiotensin systems." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **373**(4): 245-258.
- Ernsberger, P. and Koletsky, R. J. (2007). "Metabolic actions of angiotensin receptor antagonists: PPAR-gamma agonist actions or a class effect?" Current Opinion in Pharmacology **7**(2): 140-145.
- Ferre, P. and Fougelle, F. (2010). "Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c." Diabetes Obes Metab **12 Suppl 2**: 83-92.
- Ferreira, A. J., Jacoby, B. A., Araujo, C. A., Macedo, F. A., Silva, G. A., Almeida, A. P., Caliari, M. V. and Santos, R. A. (2007). "The nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist AVE-0991 attenuates heart failure induced by myocardial infarction." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(2): H1113-1119.
- Ferreira, A. J., Murca, T. M., Fraga-Silva, R. A., Castro, C. H., Raizada, M. K. and Santos, R. A. (2012). "New cardiovascular and pulmonary therapeutic strategies based on the Angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/mas receptor axis." Int J Hypertens **2012**: 147825.
- Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G. H. (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." J Biol Chem **226**(1): 497-509.
- Folli, F., Kahn, C. R., Hansen, H., Bouchie, J. L. and Feener, E. P. (1997). "Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels. A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk." J Clin Invest **100**(9): 2158-2169.
- Foretz, M., Guichard, C., Ferre, P. and Fougelle, F. (1999). "Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(22): 12737-12742.
- Fougelle, F. and Ferre, P. (2002). "New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c." Biochem J **366**(Pt 2): 377-391.
- Fraga-Silva, R. A., Pinheiro, S. V., Goncalves, A. C., Alenina, N., Bader, M. and Santos, R. A. (2008). "The antithrombotic effect of angiotensin-(1-7) involves mas-mediated NO release from platelets." Mol Med **14**(1-2): 28-35.
- Frasson, D., Boschini, R. P., Chaves, V. E., dos Santos, M. E., Gomes Sde, P., Valentim, R. R., Garofalo, M. A., Navegantes, L. C., Migliorini, R. H. and Kettelhut Ido, C. (2012). "The sympathetic nervous system regulates the three glycerol-3P generation pathways in white adipose tissue of fasted, diabetic and high-protein diet-fed rats." Metabolism **61**(10): 1473-1485.
- Fried, S. K. and Rao, S. P. (2003). "Sugars, hypertriglyceridemia, and cardiovascular disease." Am J Clin Nutr **78**(4): 873S-880S.
- Gallinat, S., Busche, S., Raizada, M. K. and Summers, C. (2000). "The angiotensin II type 2 receptor: an enigma with multiple variations." American journal of physiology. Endocrinology and metabolism **278**(3): E357-374.

## Referências Bibliográficas

- Garton, A. J., Campbell, D. G., Carling, D., Hardie, D. G., Colbran, R. J. and Yeaman, S. J. (1989). "Phosphorylation of bovine hormone-sensitive lipase by the AMP-activated protein kinase. A possible antilipolytic mechanism." Eur J Biochem **179**(1): 249-254.
- Garton, A. J., Campbell, D. G., Cohen, P. and Yeaman, S. J. (1988). "Primary structure of the site on bovine hormone-sensitive lipase phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase." FEBS Lett **229**(1): 68-72.
- Giani, J. F., Mayer, M. A., Munoz, M. C., Silberman, E. A., Hocht, C., Taira, C. A., Gironacci, M. M., Turyn, D. and Dominici, F. P. (2009). "Chronic infusion of angiotensin-(1-7) improves insulin resistance and hypertension induced by a high-fructose diet in rats." Am J Physiol Endocrinol Metab **296**(2): E262-271.
- Ginsberg, H. N. (2000). "Insulin resistance and cardiovascular disease." J Clin Invest **106**(4): 453-458.
- Graham, T. L., Mookherjee, C., Suckling, K. E., Palmer, C. N. and Patel, L. (2005). "The PPARdelta agonist GW0742X reduces atherosclerosis in LDLR(-/-) mice." Atherosclerosis **181**(1): 29-37.
- Grobe, J. L., Mecca, A. P., Lingis, M., Shenoy, V., Bolton, T. A., Machado, J. M., Speth, R. C., Raizada, M. K. and Katovich, M. J. (2007). "Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7)." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(2): H736-742.
- Guillet-Deniau, I., Mieulet, V., Le Lay, S., Achouri, Y., Carre, D., Girard, J., Fougere, F. and Ferre, P. (2002). "Sterol regulatory element binding protein-1c expression and action in rat muscles: insulin-like effects on the control of glycolytic and lipogenic enzymes and UCP3 gene expression." Diabetes **51**(6): 1722-1728.
- Hallfrisch, J. (1990). "Metabolic effects of dietary fructose." Faseb Journal **4**(9): 2652-2660.
- Heitsch, H., Brovkovich, S., Malinski, T. and Wiemer, G. (2001). "Angiotensin-(1-7)-Stimulated Nitric Oxide and Superoxide Release From Endothelial Cells." Hypertension **37**(1): 72-76.
- Horton, J. D. (2002). "Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis." Biochem Soc Trans **30**(Pt 6): 1091-1095.
- Hsieh, P. S. (2005). "Reversal of fructose-induced hypertension and insulin resistance by chronic losartan treatment is independent of AT2 receptor activation in rats." Journal of Hypertension **23**(12): 2209-2217.
- Hwang, I. S., Ho, H., Hoffman, B. B. and Reaven, G. M. (1987). "Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats." Hypertension **10**(5): 512-516.
- Ichikawa, I. and Brenner, B. M. (1980). "Importance of efferent arteriolar vascular tone in regulation of proximal tubule fluid reabsorption and glomerulotubular balance in the rat." J Clin Invest **65**(5): 1192-1201.
- Janevski, M., Ratnayake, S., Siljanovski, S., McGlynn, M. A., Cameron-Smith, D. and Lewandowski, P. (2012). "Fructose containing sugars modulate mRNA of lipogenic genes ACC and FAS and protein levels of transcription factors ChREBP and SREBP1c with no effect on body weight or liver fat." Food Funct **3**(2): 141-149.



## Referências Bibliográficas

- Janke, J., Engeli, S., Gorzelniak, K., Luft, F. C. and Sharma, A. M. (2002). "Mature adipocytes inhibit in vitro differentiation of human preadipocytes via angiotensin type 1 receptors." Diabetes **51**(6): 1699-1707.
- Jawien, J., Toton-Zuranska, J., Gajda, M., Niepsuj, A., Gebaska, A., Kus, K., Suski, M., Pyka-Fosciak, G., Nowak, B., Guzik, T. J., Marcinkiewicz, J., Olszanecki, R. and Korbut, R. (2012). "Angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist ameliorates progress of atherosclerosis in apoE-knockout mice." J Physiol Pharmacol **63**(1): 77-85.
- Jeon, T. I. and Osborne, T. F. (2012). "SREBPs: metabolic integrators in physiology and metabolism." Trends Endocrinol Metab **23**(2): 65-72.
- Karpe, F., Olivecrona, T., Olivecrona, G., Samra, J. S., Summers, L. K., Humphreys, S. M. and Frayn, K. N. (1998). "Lipoprotein lipase transport in plasma: role of muscle and adipose tissues in regulation of plasma lipoprotein lipase concentrations." J Lipid Res **39**(12): 2387-2393.
- Kasim-Karakas, S. E., Vriend, H., Almario, R., Chow, L. C. and Goodman, M. N. (1996). "Effects of dietary carbohydrates on glucose and lipid metabolism in golden Syrian hamsters." J Lab Clin Med **128**(2): 208-213.
- Kelley, G. L., Allan, G. and Azhar, S. (2004). "High dietary fructose induces a hepatic stress response resulting in cholesterol and lipid dysregulation." Endocrinology **145**(2): 548-555.
- Kersten, S. (2002). "Peroxisome proliferator activated receptors and obesity." European Journal of Pharmacology **440**(2-3): 223-234.
- Kim, J. B., Wright, H. M., Wright, M. and Spiegelman, B. M. (1998). "ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(8): 4333-4337.
- Koo, H. Y., Miyashita, M., Cho, B. H. and Nakamura, M. T. (2009). "Replacing dietary glucose with fructose increases ChREBP activity and SREBP-1 protein in rat liver nucleus." Biochem Biophys Res Commun **390**(2): 285-289.
- Kostenis, E., Milligan, G., Christopoulos, A., Sanchez-Ferrer, C. F., Heringer-Walther, S., Sexton, P. M., Gembardt, F., Kellett, E., Martini, L., Vanderheyden, P., Schultheiss, H. P. and Walther, T. (2005). "G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor." Circulation **111**(14): 1806-1813.
- Koteish, A. and Diehl, A. M. (2001). "Animal models of steatosis." Semin Liver Dis **21**(1): 89-104.
- Langin, D. (2006). "Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis." C R Biol **329**(8): 598-607; discussion 653-595.
- Lau, T., Carlsson, P. O. and Leung, P. S. (2004). "Evidence for a local angiotensin-generating system and dose-dependent inhibition of glucose-stimulated insulin release by angiotensin II in isolated pancreatic islets." Diabetologia **47**(2): 240-248.
- Leung, P. S. and Carlsson, P. O. (2005). "Pancreatic islet renin angiotensin system: its novel roles in islet function and in diabetes mellitus." Pancreas **30**(4): 293-298.

## Referências Bibliográficas

- Lewis, G. F., Carpentier, A., Adeli, K. and Giacca, A. (2002). "Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes." Endocrine Reviews **23**(2): 201-229.
- Li, P., Koike, T., Qin, B., Kubota, M., Kawata, Y., Jia, Y. J. and Oshida, Y. (2008). "A high-fructose diet impairs Akt and PKCzeta phosphorylation and GLUT4 translocation in rat skeletal muscle." Horm Metab Res **40**(8): 528-532.
- Lim, J. S., Mietus-Snyder, M., Valente, A., Schwarz, J. M. and Lustig, R. H. (2010). "The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **7**(5): 251-264.
- Liu, S. and Manson, J. E. (2001). "Dietary carbohydrates, physical inactivity, obesity, and the 'metabolic syndrome' as predictors of coronary heart disease." Curr Opin Lipidol **12**(4): 395-404.
- Machado, L. J., Marubayashi, U., Reis, A. M. and Coimbra, C. C. (1998). "The hyperglycemia induced by angiotensin II in rats is mediated by AT1 receptors." Braz J Med Biol Res **31**(10): 1349-1352.
- Mario, E. G., Santos, S. H., Ferreira, A. V., Bader, M., Santos, R. A. and Botion, L. M. (2012). "Angiotensin-(1-7) Mas-receptor deficiency decreases peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in adipocytes." Peptides **33**(1): 174-177.
- Masilamani, S., Kim, G. H., Mitchell, C., Wade, J. B. and Knepper, M. A. (1999). "Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney." J Clin Invest **104**(7): R19-23.
- Matsuzaka, T., Shimano, H., Yahagi, N., Amemiya-Kudo, M., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., Tomita, S., Sekiya, M., Hasty, A., Nakagawa, Y., Sone, H., Toyoshima, H., Ishibashi, S., Osuga, J. and Yamada, N. (2004). "Insulin-independent induction of sterol regulatory element-binding protein-1c expression in the livers of streptozotocin-treated mice." Diabetes **53**(3): 560-569.
- McGuinness, O. P. and Cherrington, A. D. (2003). "Effects of fructose on hepatic glucose metabolism." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **6**(4): 441-448.
- Mercure, C., Yogi, A., Callera, G. E., Aranha, A. B., Bader, M., Ferreira, A. J., Santos, R. A., Walther, T., Touyz, R. M. and Reudelhuber, T. L. (2008). "Angiotensin(1-7) blunts hypertensive cardiac remodeling by a direct effect on the heart." Circ Res **103**(11): 1319-1326.
- Miyazaki, M., Dobrzyn, A., Man, W. C., Chu, K., Sampath, H., Kim, H. J. and Ntambi, J. M. (2004). "Stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression is necessary for fructose-mediated induction of lipogenic gene expression by sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent and -independent mechanisms." J Biol Chem **279**(24): 25164-25171.
- Moore, M. C., Cherrington, A. D., Mann, S. L. and Davis, S. N. (2000). "Acute fructose administration decreases the glycemic response to an oral glucose tolerance test in normal adults." J Clin Endocrinol Metab **85**(12): 4515-4519.
- Moore, M. C., Connolly, C. C. and Cherrington, A. D. (1998). "Autoregulation of hepatic glucose production." Eur J Endocrinol **138**(3): 240-248.

## Referências Bibliográficas

- Morris, M. J., Wilson, W. L., Starbuck, E. M. and Fitts, D. A. (2002). "Forebrain circumventricular organs mediate salt appetite induced by intravenous angiotensin II in rats." Brain Res **949**(1-2): 42-50.
- Munoz, M. C., Giani, J. F., Burghi, V., Mayer, M. A., Carranza, A., Taira, C. A. and Dominici, F. P. (2012). "The Mas receptor mediates modulation of insulin signaling by angiotensin-(1-7)." Regul Pept.
- Munoz, M. C., Giani, J. F. and Dominici, F. P. (2010). "Angiotensin-(1-7) stimulates the phosphorylation of Akt in rat extracardiac tissues in vivo via receptor Mas." Regul Pept **161**(1-3): 1-7.
- Nilsson-Ehle, P. and Schotz, M. C. (1976). "A stable, radioactive substrate emulsion for assay of lipoprotein lipase." J Lipid Res **17**(5): 536-541.
- Oron-Herman, M., Kamari, Y., Grossman, E., Yeager, G., Peleg, E., Shabtay, Z., Shamiss, A. and Sharabi, Y. (2008). "Metabolic syndrome: comparison of the two commonly used animal models." American Journal of Hypertension **21**(9): 1018-1022.
- Osborne, T. F. and Espenshade, P. J. (2009). "Evolutionary conservation and adaptation in the mechanism that regulates SREBP action: what a long, strange tRIP it's been." Genes Dev **23**(22): 2578-2591.
- Ouyang, X., Cirillo, P., Sautin, Y., McCall, S., Bruchette, J. L., Diehl, A. M., Johnson, R. J. and Abdelmalek, M. F. (2008). "Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease." J Hepatol **48**(6): 993-999.
- Park, O. J., Cesar, D., Faix, D., Wu, K., Shackleton, C. H. and Hellerstein, M. K. (1992). "Mechanisms of fructose-induced hypertriglyceridaemia in the rat. Activation of hepatic pyruvate dehydrogenase through inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase." Biochem J **282** ( Pt 3): 753-757.
- Parks, E. J. and Hellerstein, M. K. (2000). "Carbohydrate-induced hypertriacylglycerolemia: historical perspective and review of biological mechanisms." Am J Clin Nutr **71**(2): 412-433.
- Paula, R. D., Lima, C. V., Khosla, M. C. and Santos, R. A. (1995). "Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats." Hypertension **26**(6 Pt 2): 1154-1159.
- Peach, M. J. (1977). "Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action." Physiol Rev **57**(2): 313-370.
- Peti-Peterdi, J., Warnock, D. G. and Bell, P. D. (2002). "Angiotensin II directly stimulates ENaC activity in the cortical collecting duct via AT(1) receptors." Journal of the American Society of Nephrology **13**(5): 1131-1135.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.
- Pilkis, S. J. and Granner, D. K. (1992). "Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis." Annu Rev Physiol **54**: 885-909.
- Pinheiro, S. V., Ferreira, A. J., Kitten, G. T., da Silveira, K. D., da Silva, D. A., Santos, S. H., Gava, E., Castro, C. H., Magalhaes, J. A., da Mota, R. K., Botelho-Santos, G. A., Bader, M., Alenina, N., Santos, R. A. and Simoes e Silva, A. C. (2009). "Genetic deletion of the

angiotensin-(1-7) receptor Mas leads to glomerular hyperfiltration and microalbuminuria." Kidney International **75**(11): 1184-1193.

Pinheiro, S. V., Simoes e Silva, A. C., Sampaio, W. O., de Paula, R. D., Mendes, E. P., Bontempo, E. D., Pesquero, J. B., Walther, T., Alenina, N., Bader, M., Bleich, M. and Santos, R. A. (2004). "Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney." Hypertension **44**(4): 490-496.

Qureshi, K. and Abrams, G. A. (2007). "Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease." World J Gastroenterol **13**(26): 3540-3553.

Ramnanan, C. J., Edgerton, D. S., Kraft, G. and Cherrington, A. D. (2011). "Physiologic action of glucagon on liver glucose metabolism." Diabetes Obes Metab **13 Suppl 1**: 118-125.

Ramracheya, R. D., Muller, D. S., Wu, Y., Whitehouse, B. J., Huang, G. C., Amiel, S. A., Karalliedde, J., Viberti, G., Jones, P. M. and Persaud, S. J. (2006). "Direct regulation of insulin secretion by angiotensin II in human islets of Langerhans." Diabetologia **49**(2): 321-331.

Randle, P. J., Garland, P. B., Hales, C. N. and Newsholme, E. A. (1963). "The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus." Lancet **1**(7285): 785-789.

Reaven, G. M. and Chen, Y. D. (1988). "Role of insulin in regulation of lipoprotein metabolism in diabetes." Diabetes Metab Rev **4**(7): 639-652.

Reinhart, P. H., Taylor, W. M. and Bygrave, F. L. (1982). "Studies on alpha-adrenergic-induced respiration and glycogenolysis in perfused rat liver." J Biol Chem **257**(4): 1906-1912.

Rutledge, A. C. and Adeli, K. (2007). "Fructose and the metabolic syndrome: pathophysiology and molecular mechanisms." Nutr Rev **65**(6 Pt 2): S13-23.

Saltiel, A. R. and Kahn, C. R. (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism." Nature **414**(6865): 799-806.

Sampaio, W. O., Souza dos Santos, R. A., Faria-Silva, R., da Mata Machado, L. T., Schiffrin, E. L. and Touyz, R. M. (2007). "Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways." Hypertension **49**(1): 185-192.

Santiago, N. M., Guimaraes, P. S., Sirvente, R. A., Oliveira, L. A., Irigoyen, M. C., Santos, R. A. and Campagnole-Santos, M. J. (2010). "Lifetime overproduction of circulating Angiotensin-(1-7) attenuates deoxycorticosterone acetate-salt hypertension-induced cardiac dysfunction and remodeling." Hypertension **55**(4): 889-896.

Santos, R. A., Simoes e Silva, A. C., Maric, C., Silva, D. M., Machado, R. P., de Buhr, I., Heringer-Walther, S., Pinheiro, S. V., Lopes, M. T., Bader, M., Mendes, E. P., Lemos, V. S., Campagnole-Santos, M. J., Schultheiss, H. P., Speth, R. and Walther, T. (2003). "Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8258-8263.

Santos, S. H., Braga, J. F., Mario, E. G., Porto, L. C., Rodrigues-Machado Mda, G., Murari, A., Botion, L. M., Alenina, N., Bader, M. and Santos, R. A. (2010). "Improved lipid and

## Referências Bibliográficas

glucose metabolism in transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1-7)." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(5): 953-961.

Santos, S. H., Fernandes, L. R., Mario, E. G., Ferreira, A. V., Porto, L. C., Alvarez-Leite, J. I., Botion, L. M., Bader, M., Alenina, N. and Santos, R. A. (2008). "Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism." Diabetes **57**(2): 340-347.

Savergnini, S. Q., Beiman, M., Lautner, R. Q., de Paula-Carvalho, V., Allahdadi, K., Pessoa, D. C., Costa-Fraga, F. P., Fraga-Silva, R. A., Cojocar, G., Cohen, Y., Bader, M., de Almeida, A. P., Rotman, G. and Santos, R. A. (2010). "Vascular relaxation, antihypertensive effect, and cardioprotection of a novel peptide agonist of the MAS receptor." Hypertension **56**(1): 112-120.

Shanmugam, S. and Sandberg, K. (1996). "Ontogeny of angiotensin II receptors." Cell Biol Int **20**(3): 169-176.

Sharma, A. M., Janke, J., Gorzelniak, K., Engeli, S. and Luft, F. C. (2002). "Angiotensin blockade prevents type 2 diabetes by formation of fat cells." Hypertension **40**(5): 609-611.

Sharma, A. M. and Staels, B. (2007). "Review: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and adipose tissue--understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism." J Clin Endocrinol Metab **92**(2): 386-395.

Shimomura, I., Bashmakov, Y. and Horton, J. D. (1999). "Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus." J Biol Chem **274**(42): 30028-30032.

Shimomura, I., Shimano, H., Horton, J. D., Goldstein, J. L. and Brown, M. S. (1997). "Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells." J Clin Invest **99**(5): 838-845.

Siragy, H. M. and Carey, R. M. (1999). "Protective role of the angiotensin AT2 receptor in a renal wrap hypertension model." Hypertension **33**(5): 1237-1242.

Subramanian, S. and Chait, A. (2012). "Hypertriglyceridemia secondary to obesity and diabetes." Biochim Biophys Acta **1821**(5): 819-825.

Sugden, M. C. (2007). "In appreciation of Sir Philip Randle: the glucose-fatty acid cycle." Br J Nutr **97**(5): 809-813.

Sutherland, C., O'Brien, R. M. and Granner, D. K. (1996). "New connections in the regulation of PEPCK gene expression by insulin." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **351**(1336): 191-199.

Tahmasebi, M., Puddefoot, J. R., Inwang, E. R. and Vinson, G. P. (1999). "The tissue renin-angiotensin system in human pancreas." J Endocrinol **161**(2): 317-322.

Tangirala, R. K., Takata, Y., Liu, J., Yin, F., Collins, A. R., Lyon, C. J., Lee, C. H., Atkins, A. R., Downes, M., Barish, G. D., Evans, R. M. and Hsueh, W. A. (2008). "PPAR delta-mediated antiinflammatory mechanisms inhibit angiotensin II-accelerated atherosclerosis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**(11): 4277-4282.

Tappy, L. and Le, K. A. (2010). "Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity." Physiol Rev **90**(1): 23-46.

## Referências Bibliográficas

- Tappy, L. and Le, K. A. (2012). "Does fructose consumption contribute to non-alcoholic fatty liver disease?" Clin Res Hepatol Gastroenterol.
- Tappy, L., Le, K. A., Tran, C. and Paquot, N. (2010). "Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions." Nutrition **26**(11-12): 1044-1049.
- Timmermans, P. B., Wong, P. C., Chiu, A. T., Herblin, W. F., Benfield, P., Carini, D. J., Lee, R. J., Wexler, R. R., Saye, J. A. and Smith, R. D. (1993). "Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists." Pharmacol Rev **45**(2): 205-251.
- Topping, D. L. and Mayes, P. A. (1972). "The immediate effects of insulin and fructose on the metabolism of the perfused liver. Changes in lipoprotein secretion, fatty acid oxidation and esterification, lipogenesis and carbohydrate metabolism." Biochem J **126**(2): 295-311.
- Toton-Zuranska, J., Gajda, M., Pyka-Fosciak, G., Kus, K., Pawlowska, M., Niepsuj, A., Wolkow, P., Olszanecki, R., Jawien, J. and Korbut, R. (2010). "AVE 0991-angiotensin-(1-7) receptor agonist, inhibits atherogenesis in apoE-knockout mice." J Physiol Pharmacol **61**(2): 181-183.
- Tounian, P., Schneiter, P., Henry, S., Jequier, E. and Tappy, L. (1994). "Effects of infused fructose on endogenous glucose production, gluconeogenesis, and glycogen metabolism." Am J Physiol **267**(5 Pt 1): E710-717.
- Ueno, M., Bezerra, R. M., Silva, M. S., Tavares, D. Q., Carvalho, C. R. and Saad, M. J. (2000). "A high-fructose diet induces changes in pp185 phosphorylation in muscle and liver of rats." Braz J Med Biol Res **33**(12): 1421-1427.
- Unger, R. H. (2003). "Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome." Endocrinology **144**(12): 5159-5165.
- van Herpen, N. A. and Schrauwen-Hinderling, V. B. (2008). "Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity." Physiol Behav **94**(2): 231-241.
- Velloso, L. A., Folli, F., Sun, X. J., White, M. F., Saad, M. J. and Kahn, C. R. (1996). "Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(22): 12490-12495.
- Vickers, C., Hales, P., Kaushik, V., Dick, L., Gavin, J., Tang, J., Godbout, K., Parsons, T., Baronas, E., Hsieh, F., Acton, S., Patane, M., Nichols, A. and Tummino, P. (2002). "Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase." J Biol Chem **277**(17): 14838-14843.
- White, U. A. and Stephens, J. M. (2010). "Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue." Mol Cell Endocrinol **318**(1-2): 10-14.
- Wiemer, G., Dobrucki, L. W., Louka, F. R., Malinski, T. and Heitsch, H. (2002). "AVE 0991, a nonpeptide mimic of the effects of angiotensin-(1-7) on the endothelium." Hypertension **40**(6): 847-852.
- Wong, P. C., Hart, S. D., Zaspel, A. M., Chiu, A. T., Ardecky, R. J., Smith, R. D. and Timmermans, P. B. (1990). "Functional studies of nonpeptide angiotensin II receptor subtype-specific ligands: DuP 753 (All-1) and PD123177 (All-2)." The Journal of pharmacology and experimental therapeutics **255**(2): 584-592.

## Referências Bibliográficas

Wong, P. C., Price, W. A., Jr., Chiu, A. T., Duncia, J. V., Carini, D. J., Wexler, R. R., Johnson, A. L. and Timmermans, P. B. (1990). "Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. XI. Pharmacology of EXP3174: an active metabolite of DuP 753, an orally active antihypertensive agent." The Journal of pharmacology and experimental therapeutics **255**(1): 211-217.

Wu, L., Iwai, M., Nakagami, H., Chen, R., Suzuki, J., Akishita, M., de Gasparo, M. and Horiuchi, M. (2002). "Effect of angiotensin II type 1 receptor blockade on cardiac remodeling in angiotensin II type 2 receptor null mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(1): 49-54.

Wu, L., Iwai, M., Nakagami, H., Li, Z., Chen, R., Suzuki, J., Akishita, M., de Gasparo, M. and Horiuchi, M. (2001). "Roles of angiotensin II type 2 receptor stimulation associated with selective angiotensin II type 1 receptor blockade with valsartan in the improvement of inflammation-induced vascular injury." Circulation **104**(22): 2716-2721.

Wu, Z., Xie, Y., Morrison, R. F., Bucher, N. L. and Farmer, S. R. (1998). "PPARgamma induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBPalpha during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes." J Clin Invest **101**(1): 22-32.

Yokoyama, C., Wang, X., Briggs, M. R., Admon, A., Wu, J., Hua, X., Goldstein, J. L. and Brown, M. S. (1993). "SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene." Cell **75**(1): 187-197.

Yu, C., Chen, Y., Cline, G. W., Zhang, D., Zong, H., Wang, Y., Bergeron, R., Kim, J. K., Cushman, S. W., Cooney, G. J., Atcheson, B., White, M. F., Kraegen, E. W. and Shulman, G. I. (2002). "Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle." J Biol Chem **277**(52): 50230-50236.

Zammit, V. A., Waterman, I. J., Topping, D. and McKay, G. (2001). "Insulin stimulation of hepatic triacylglycerol secretion and the etiology of insulin resistance." J Nutr **131**(8): 2074-2077.

Zisman, A., Peroni, O. D., Abel, E. D., Michael, M. D., Mauvais-Jarvis, F., Lowell, B. B., Wojtaszewski, J. F., Hirshman, M. F., Virkamaki, A., Goodyear, L. J., Kahn, C. R. and Kahn, B. B. (2000). "Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance." Nat Med **6**(8): 924-928.