

ANALINA RAQUEL DA SILVA

**Efeito da Deleção Genética Combinada do Receptor Mas e da
Apolipoproteína E no Metabolismo Lipídico de Camundongos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Robson Augusto Souza dos Santos
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte - MG

2013

Dedico este trabalho à minha família,
representação Divina em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida.

Ao Prof. Robson por me receber de braços abertos e ter acreditado no meu potencial como pesquisadora. Com excelência e dedicação me ensinou os “caminhos” do universo da ciência.

À minha família, pelo amor e apoio incondicionais. Vocês são o suporte, exemplos de vida, alegria e união, que me ensinam e me fortalecem!

Aos colegas do Laboratório de Hipertensão pelo grande incentivo, colaborações e momentos de descontração. Aqui, em especial agradeço aos meus amigos Suellen, Janaína, Neiva, Sílvia, Augusto Peluso e Gonzaga pela adorável convivência e pelo auxílio sempre que precisei.

À Aline e à Cynthia por me atenderem sempre que precisei.

À Mari, pela amizade, compreensão e pelas palavras de carinho!

Ao Marcos Melo pelo seu excelente trabalho.

Ao meu querido colaborador Edenil. Obrigada por tornar nosso trabalho muito mais alegre e agradável. Hoje não só um colaborador com também um grande amigo!

À Profa. Jacqueline pelos animais, colaborações e ensinamentos.

Às meninas do LABIN por sempre me receberem como parte da equipe.

À Profa. Rosa pela colaboração, dedicação e por me mostrar novos pontos de vistas.

À Profa. Rafaela pela oportunidade de parceria com o Fabrizio Montecucco.

Aos colegas do laboratório de Cardiologia da Faculdade de Medicina de Genebra, pela colaboração e por me receberem tão carinhosamente.

Aos amigos do departamento, em especial à Fernanda que sempre alegrou minhas manhãs.

Ao Programa de Pós Graduação em Fisiologia e Farmacologia pela oportunidade. Agradecimento especial às nossas secretárias Nilda e Cyntia.

Às técnicas Ilma e Luíza, pelo cuidado essencial com os animais utilizados nos experimentos.

Às agências de fomento, CAPES, FAPEMIG e CNPq, pelo suporte financeiro.

Aos meus verdadeiros amigos, que transformaram tempos em momentos!

A todos vocês minha sincera admiração e muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
SUMÁRIO	VIII
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Metabolismo lipídico.....	1
1.1.1. Lipoproteínas.....	3
1.2. Tecido adiposo como órgão secretor.....	6
1.2.1. Leptina.....	6
1.2.2. Resistina.....	8
1.3. Lipodistrofia.....	9
1.4. Aterosclerose.....	12
1.5. Doença hepática gordurosa não alcoólica.....	15
1.6. Receptores nucleares na patogênese da NAFLD e aterosclerose.....	17
1.6.1. PPAR α	16
1.6.2. LXR.....	19
1.7. Sistema renina angiotensina.....	20
1.7.1. Interação do eixo ECA/AngII/AT1 com o metabolismo, esteatose e aterosclerose.....	23

1.7.2. Interação do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas com o metabolismo, esteatose e aterosclerose.....	25
1.8. Modelos de camundongos com deleção gênica: Mas e ApoE.....	26
2. JUSTIFICATIVA.....	29
3. OBJETIVOS.....	31
3.1. Objetivo geral.....	31
3.2. Objetivos específicos.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1. Animais.....	32
4.2. Genotipagem.....	32
4.2.1. Extração do DNA genômico.....	32
4.2.2. PCR e detecção de produtos amplificados em gel de agarose	33
4.3. Peso corporal e peso de órgãos.....	33
4.4. Amostras de sangue.....	34
4.5. Avaliação do perfil lipídico.....	34
4.6. Verificação do perfil lipídico hepático.....	34
4.7. Avaliação da glicemia.....	35
4.8. Determinação dos níveis séricos de leptina, resistina e CCL2.....	35
4.9. Avaliação da função hepática.....	35
4.10. Peroxidação lipídica hepática: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	36
4.11. Histologia do tecido hepático.....	36
4.12. Extração de proteínas totais.....	36

4.13. Western Blotting.....	37
4.14. Real time RT-PCR.....	38
4.15. Avaliação da aterosclerose.....	40
4.15.1. Área de lesão na aorta e válvula aórtica.....	40
4.15.2. Imunohistoquímica.....	41
4.15.3. Avaliação da deposição de colágeno na válvula aórtica.....	41
4.16. Ultrassonografia de alta resolução.....	41
4.17. Análise estatística.....	42
5. RESULTADOS.....	43
5.1. Peso corporal e peso dos tecidos hepático e adiposo.....	43
5.2. Parâmetros bioquímicos.....	43
5.2.1. Perfil lipídico.....	43
5.2.2. Perfil glicêmico.....	44
5.2.3. Níveis séricos de adipocinas.....	45
5.3. Avaliação da função hepática e da esteatose.....	46
5.3.1. Dosagem sérica da alanina aminotransferase (ALT).....	46
5.3.2. Peroxidação lipídica no fígado.....	47
5.3.3. Conteúdo hepático de lipídios.....	48
5.3.4. Análise histopatológica do fígado.....	48
5.4. Expressão de proteínas envolvidas no metabolismo hepático.....	51
5.4.1. Receptor de insulina.....	51
5.4.2. Receptor ativado por proliferador de peroxissomo α - PPAR α	52

5.4.3. Receptor X do fígado – LXR.....	53
5.4.4. Glicogênio fosforilase - GP e Glicose 6-fosfatase – G6Pase.....	54
5.5. Avaliação da aterosclerose.....	55
5.6. Marcadores inflamatórios.....	57
5.6.1. Níveis séricos de CCL2.....	57
5.6.2. Expressão de marcadores de linfócitos.....	58
5.7. Avaliação ecocardiográfica.....	59
6. DISCUSSÃO.....	62
7. SUMÁRIO E CONCLUSÕES.....	69
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers e sondas utilizados para real-time PCR.....	39
Tabela 2. Peso corporal (g) e peso relativo do fígado e tecido adiposo epididimal (mg/g de peso corporal) de camundongos WT, Mas-KO, ApoE-KO e DKO.....	43
Tabela 3. Perfil lipídico dos camundongos WT, Mas-KO, ApoE-KO e DKO...	44
Tabela 4. Perfil lipídico hepático dos camundongos WT, Mas-KO, ApoE-KO e DKO.....	48
Tabela 5. Imunohistoquímica para macrófagos (CD68+), neutrófilos (Ly-6B.2), MMP-9, MMP-8, linfócitos (CD3+) e CMLV, e deposição de colágeno em secções de raiz aórtica de camundongos ApoE-KO e DKO.....	57
Tabela 6: Parâmetros cardíacos funcionais dos camundongos WT, Mas-KO, ApoE-KO e DKO.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo das lipoproteínas.....	5
Figura 2. Ilustração esquemática da hipótese da “expansibilidade adiposa”.....	11
Figura 3. Composição celular da placa aterosclerótica.....	14
Figura 4. Papel dos ácidos graxos na patogênese da esteatose.....	17
Figura 5. O sistema renina-angiotensina clássico.....	22
Figura 6. Glicemia de jejum dos camundongos WT, Mas-KO, ApoE-KO e DKO.....	45
Figura 7. Níveis séricos de adipocinas.....	46
Figura 8. Níveis séricos da ALT.....	47
Figura 9. Peroxidação lipídica no fígado dos camundongos WT, Mas-KO, ApoE-KO e DKO.....	47
Figura 10. Aspectos histológicos de fígados dos grupos WT, Mas-KO, ApoE-KO e DKO.....	50
Figura 11. Expressão hepática do receptor de insulina.....	51
Figura 12. Expressão hepática do PPAR α	52
Figura 13. Expressão hepática do LXR.....	53
Figura 14. Expressão hepática da glicogênio fosforilase e glicose 6-fosfatase.....	54
Figura 15. Área de lesão nas aortas dos camundongos ApoE-KO e DKO...	55
Figura 16. Área de lesão aterosclerótica na raiz da aorta dos camundongos ApoE-KO e DKO.....	56
Figura 17. Níveis séricos de CCL2 em camundongos ApoE-KO e DKO.....	58
Figura 18. Expressão do mRNA em aorta e baço de camundongos ApoE-KO e DKO.....	59
Figura 19. Espessamento médio-intimal em camundongos WT, Mas-KO, ApoE-KO e DKO.....	61
Figura 20. Representação esquemática dos efeitos da deleção genética do receptor Mas e da apolipoproteína E no metabolismo lipídico e em patologias relacionadas.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

DCV	Doenças cardiovasculares
HDL	Lipoproteína de densidade alta
AGNE	Ácidos graxos não esterificados
NAFLD	Doença hepática gordurosa não alcoólica
PPARγ	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma γ
SRA	Sistema renina-angiotensina
ECA	Enzima conversora de angiotensina
Ang-(1-7)	Angiotensina-(1-7)
AG	Ácidos graxos
TAG	Triacilgliceróis
VLDL	Lipoproteínas de densidade muito baixa
Apo	Apolipoproteínas
LDL	Lipoproteínas de densidade baixa
IDL	Lipoproteínas de densidade intermediária
TRC	Transporte reverso do colesterol
oxLDL	LDL oxidado
MCP1/CCL2	Proteína quimiotática de monócitos 1
CMLV	Células do músculo liso vascular
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
Treg	Células T regulatórias
NASH	Esteatohepatite não alcoólica
LXR	Receptor X do fígado
PPARα	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma α
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
NO	Óxido nítrico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
MMP	Metaloproteinase
Mas-KO	Camundongos com deleção do protooncogene Mas
ApoE-KO	Camundongos deficientes da ApoE
DKO	Camundongos duplo- <i>knockout</i> para o receptor Mas e para a ApoE

CT	Colesterol total
ALT	Alanina aminotransferase
MDA	Malondialdeído
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
IMT	Espessura da íntima-média
GP	Glicogênio fosofrilase
G6Pase	Glicose 6-fosfatase
Fej	Fração de ejeção
FE	Fração de encurtamento
VS	Volume sistólico
DC	Débito cardíaco
FC	Frequência cardíaca

1. INTRODUÇÃO

A partir do século XX, as doenças cardiovasculares (DCV) foram reconhecidas como a principal causa de morbimortalidade do mundo moderno. Desde então, os pesquisadores vêm buscando a compreensão dos eventos biológicos subjacentes a essas doenças e a identificação dos fatores de risco associados a tais enfermidades. A partir destes estudos, um aglomerado de fatores de risco foi descrito, mas se destacava sempre a presença simultânea de obesidade, hiperlipidemia e hipertensão arterial. Todos esses eventos relacionados e sua associação com a resistência à insulina levaram os cientistas a propor a existência de uma única condição fisiopatológica, denominada síndrome metabólica (KAHN et al., 2005).

A síndrome metabólica tem sido descrita de vários modos por diferentes organizações. De maneira simplificada, ela é um complexo inter-relacionado de fatores de risco para as doenças cardiovasculares e diabetes (ALBERTI et al., 2009), sendo também relacionada com outros interesses médicos, como danos renais, apneia obstrutiva do sono, síndrome do ovário policístico e aumento do risco de demência em idosos. Além disso, a síndrome metabólica também está intimamente associada com a esteatose hepática, que por sua vez, pode desencadear esteatohepatite e cirrose. Os fatores de risco mais comuns da síndrome metabólica incluem disglícemia, hipertensão, hipertrigliceridemia, baixos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) e obesidade (ALBERTI et al., 2009).

1.1. Metabolismo lipídico

O metabolismo lipídico envolve diversas vias que são, até certo ponto, interdependentes e com “regulação cruzada”. O equilíbrio entre a deposição e a mobilização de lipídeos do tecido adiposo, estabelece o conteúdo de gordura corporal. Os ácidos graxos (AG) são a forma de energia predominantemente circulante e estocada, e os triacilgliceróis (TAG) são a forma mais comum de ácidos graxos não tóxicos (NGUYEN et al., 2008).

Os AG podem ser obtidos através da dieta ou produzidos pelo próprio organismo, em um processo conhecido como lipogênese ou síntese *de novo* (ver CURTI et al., 2002). A síntese de ácidos graxos ocorre principalmente no fígado, rins

e glândulas mamárias, bem como nas células adiposas, cerebrais e pulmonares (ver CURI et al., 2002). É bem estabelecido que dietas ricas em carboidratos e o consequente aumento da secreção de insulina pelo pâncreas estimulam a atividade lipogênica, enquanto que o jejum inibe este processo (KERSTEN, 2001). Em resumo, ácidos graxos não esterificados (AGNE) ou na forma de TAG são ingeridos na dieta ou sintetizados no fígado. O adipócito realiza muito pouca lipogênese (BOUCHARD et al., 1990).

Os ácidos graxos e triacilgliceróis também podem ser usados de diferentes modos, sendo que os AG constituem a principal fonte energética para muitos órgãos, especialmente músculos e fígado. Os TAG são a principal fonte de ácidos graxos armazenados nos adipócitos, provenientes tanto dos quilomícrons intestinais como das lipoproteínas hepáticas (JOHNSON e GREENWOOD, 1988). Uma vez que a maioria dos tecidos contém pouco estoque de lipídeos, o fluxo de AGNE é primariamente dependente dos TAG armazenados no tecido adiposo os quais são liberados deste pelo processo de lipólise, e transportados para os tecidos onde são oxidados para produção de energia (ver CURI et al., 2002).

Assim, os AGNE provenientes do tecido adiposo constituem uma fonte energética alternativa à glicose, poupando essa para os requerimentos do cérebro e das células sanguíneas e também reduzindo a utilização dos aminoácidos corporais como substratos para a gliconeogênese (ARNER, 2001). O balanço entre o conteúdo de TAG nos hepatócitos é regulado pela atividade de moléculas celulares que facilitam a captação, síntese e esterificação de AG, e a oxidação e exportação de TAG hepáticos (NGUYEN et al., 2008). Esta regulação mantém constante a concentração de triacilgliceróis circulantes. Quando ocorre um influxo aumentado de ácidos graxos, o fígado responde aumentando a esterificação e oxidação. Entretanto, se houver limitação na taxa de oxidação de ácidos graxos e/ou de sua capacidade em secretar lipoproteínas de densidade muito baixa (*very low density lipoprotein* – VLDL), a consequência é o aumento do armazenamento de triacilgliceróis dentro do hepatócito, condição denominada esteatose hepática.

1.1.1. Lipoproteínas

Os lipídeos são compostos apolares e, por isso, insolúveis em água. Desse modo eles são transportados pelo plasma sanguíneo na forma de lipoproteínas, que

são complexos moleculares de proteínas transportadoras específicas chamadas de apolipoproteínas (apo) com combinações variadas de fosfolípidios, colesterol, ésteres de colesterol e triacilgliceróis (NELSON e COX, 2006).

As apolipoproteínas, além de atuarem no transporte de lipídeos, possuem diversas outras funções tais como proporcionar locais para o reconhecimento de receptores da superfície celular, e servindo como ativadores ou coenzimas para as enzimas envolvidas no metabolismo lipoproteínas. Algumas das apolipoproteínas são exigidas como componentes estruturais essenciais das partículas lipoprotéicas e não podem ser removidas enquanto outras são transferidas livremente entre lipoproteínas. As apolipoproteínas estão divididos por função e estrutura em cinco grandes categorias, de A a E (CHAMPE et al., 2007).

As lipoproteínas são complexos esféricos com lipídios hidrofóbicos no centro e as cadeias laterais hidrofílicas dos aminoácidos das proteínas na superfície (NELSON e COX, 2006). Cada classe de lipoproteína tem uma função específica, determinada por seu lugar de síntese, composição lipídica e conteúdo de apolipoproteína (NELSON e COX, 2006). Os quilomícrons são as lipoproteínas de menor densidade e maior tamanho. As VLDLs e as lipoproteínas de densidade baixa (*low density lipoprotein* – LDL) são sucessivamente mais densas, com maiores proporções de proteínas em relação aos lipídeos. As lipoproteínas de densidade alta (*high density lipoprotein* – HDL) são as partículas mais densas (CHAMPE et al., 2007).

Os lipídios da dieta deixam as células intestinais conjugados em quilomícrons através de um processo que requer a apo B-48 (KWITEROVICH, 2000). Os triacilgliceróis no núcleo dos quilomícrons são hidrolisados em ácidos graxos livres e glicerol pela lipase lipoprotéica com a apo C-II como um cofator, produzindo um quilomícron remanescente pequeno (KWITEROVICH, 2000). Os remanescentes dos quilomícrons, privados da maior parte de seus triacilgliceróis, mas ainda contendo colesterol, apo E e apo B-48, movem-se da corrente sanguínea para o fígado. No fígado, existem receptores que reconhecem a apo E e essa ligação promove captação dos quilomícrons por endocitose (NELSON e COX, 2006).

Um retardo na remoção dos quilomícrons remanescentes pode promover a aterogênese (KWITEROVICH, 2000). Estudos mostram que pacientes com doença arterial coronariana possuem elevação dos níveis pós-prandiais de triacilgliceróis e

um retardo no retorno dos triacilgliceróis aos níveis basais, devido a uma lentidão na remoção das partículas dos quilomícrons remanescentes (PATSCHE et al., 1992).

Quando a dieta contém mais lipídeos que a quantidade necessária como combustível, estes são convertidos em triacilgliceróis no fígado e unidos a apolipoproteínas específicas para formar as VLDL (NELSON e COX, 2006). Essas transportam TAG do fígado para os tecidos periféricos.

As VLDL são sintetizadas e secretadas pelo fígado em um processo que requer a apo B-100 (KWITEROVICH, 2000). No plasma, o triacilglicerol presente na VLDL é clivado em ácidos graxos livres e glicerol pela lipase lipoprotéica (KWITEROVICH, 2000). A perda de triacilgliceróis converte algumas VLDL em VLDL remanescentes, que são também chamadas de lipoproteínas de densidade intermediária – as IDL (Intermediate Density Lipoprotein) (Nelson e Cox, 2006). Elas são uma classe heterogênea de partículas que normalmente não se acumulam no plasma (LICHTENSTEIN et al., 1996) (Figura 1).

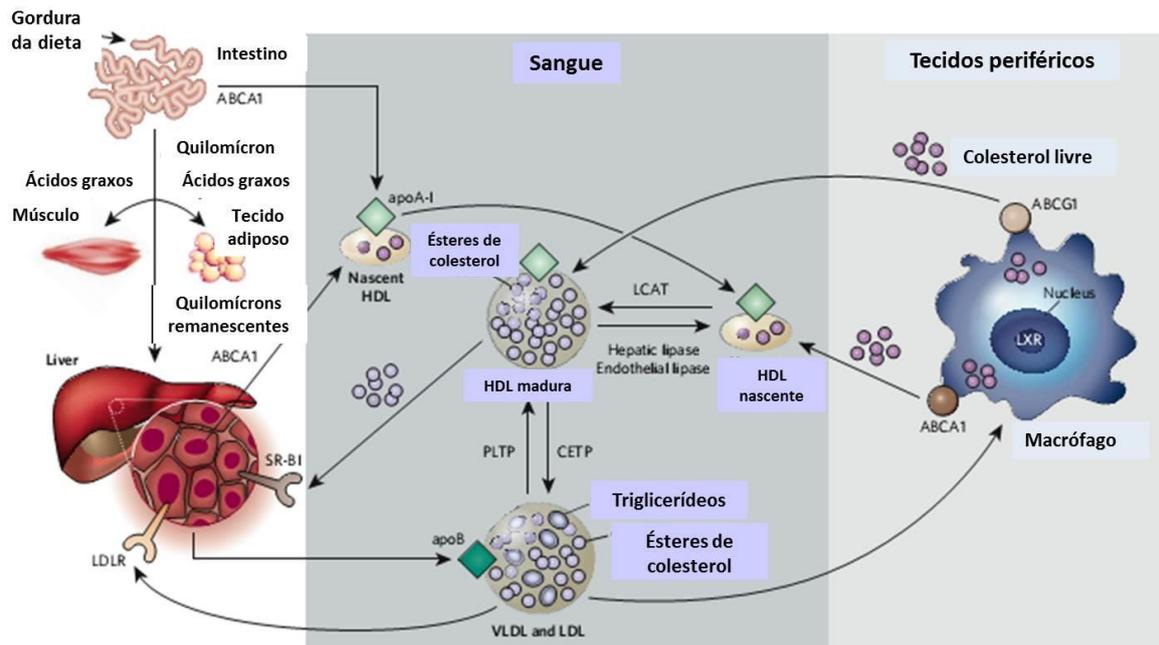


Figura 1. Metabolismo das lipoproteínas. O metabolismo das lipoproteínas envolve o transporte de lipídeos, particularmente colesterol e triacilglicerol (TAG), no sangue. O intestino absorve a gordura da dieta e empacota em quilomícrons, os quais são transportados aos tecidos periféricos através do sangue. No músculo e tecido adiposo, a enzima lipase lipoprotéica libera os ácidos graxos dos quilomícrons. Os quilomícrons remanescentes são então captados pelo fígado. O fígado carrega a apoB de lipídeos e secreta as VLDLs (*very-low-density lipoproteins*), as quais sofrem lipólise pela lipase lipoprotéica para formar as LDLs (*low-density lipoproteins*). As LDLs são captadas pelo fígado através do receptor de LDL (LDLR), bem como através de outras vias. As HDLs (*high-density lipoproteins*) são formadas pelo intestino e fígado através da secreção de apoA-I livre de lipídeos. A apoA-I recruta colesterol destes órgãos através dos transportadores ABCA1, formando as HDLs nascentes. Nos tecidos periféricos, as HDLs nascentes promove o efluxo do colesterol dos tecidos, incluindo macrófagos, através da ação da ABCA1. As HDLs maduras também promovem o efluxo através da ABCG1 (em macrófagos, o LXR regula a produção da ABCA1 e ABCG1). O colesterol livre (não esterificado) nas HDLs nascentes é esterificado em ésteres de colesterol pela enzima LCAT (lecitina aciltransferase), formando HDLs maduras. O conteúdo de lipídeos das HDLs é alterado pelas enzimas lipase hepática e lipase endotelial, e pelas proteínas de transferência CETP e PLTP (proteína de transferência de fosfolípidos), afetando o catabolismo da HDL. Adaptado de RADER e DAUGHERTY (2008).

Algumas das partículas IDL são removidas por interações da apo E com o receptor de LDL na superfície do fígado, ou os triglicerídeos das IDL podem ser

hidrolisados pela lipase hepática para produzir as LDL (KWITEROVICH, 2000). As LDL transportam o colesterol para os tecidos periféricos (extra-hepáticos), que possuem receptores de superfície específicos para ela através da interação com a apo B-100 (NELSON e COX, 2006).

O HDL recebe o colesterol dos remanescentes de quilomícrons e VLDL e os transporta para o fígado, onde o colesterol é liberado e parte dele é convertida em sais biliares (NELSON e COX, 2006). Esse processo conhecido como transporte reverso do colesterol (TRC) protege o organismo contra aumentos das LDLs e consequentemente do seu acúmulo na parede vascular.

1.2. Tecido adiposo como órgão secretor

O tecido adiposo secreta um surpreendente número de substâncias com efeito sistêmico, neuro-endócrino, autócrino/parácrino (KERSHAW e FLIER, 2004). As adipocinas, ou produtos secretados pelo tecido adiposo, desempenham um papel importante na homeostasia energética, sensibilidade à insulina, resposta imunológica e doença vascular (PRINS, 2002; KERSHAW e FLIER, 2004).

1.2.1. Leptina

A leptina é um hormônio proteico de 16 kDa, produto do gene obeso (*ob*), que possui efeitos comprovados sobre o metabolismo energético, e foi descoberta em 1994, em camundongos geneticamente obesos (ZHANG et al., 1994).

A sua produção é regulada pelas alterações induzidas pela insulina no adipócito e os seus níveis correlacionam-se com a massa de tecido adiposo (CONSIDINE et al., 1996). Dessa forma, pacientes com lipodistrofia apresentam diminuição nos níveis de leptina (ORAL et al., 2002; PETERSEN et al., 2002) e obesos apresentam aumento dos níveis dessa adipocina (CAPRIO et al., 1996)

A leptina possui um importante papel na regulação do balanço energético e sua ligação a seus receptores hipotalâmicos transmitem informação relativa à massa de tecido adiposo e depósitos energéticos existentes. A ligação da leptina aos seus receptores estimula a expressão de neuropeptídeos anorexígenos como POMC (Proopiomelanocortina), CRH (Hormônio Liberador de Corticotropina) e

CART (Transcrito Regulado por Cocaína e Anfetamina) que diminuem a ingestão de alimentos gerando sensação de saciedade (COWLEY et al., 2001). No mesmo núcleo, a leptina inibe a expressão do peptídeo *agouti* (AgRP) e do neuropeptídeo Y, envolvidos nos mecanismos de aumento da ingestão alimentar e na redução do gasto energético (JEQUIER, 2002; AHIMA e OSEI, 2004).

Os efeitos da leptina também se estendem ao metabolismo lipídico, tendo um importante papel na regulação do balanço entre β -oxidação mitocondrial e síntese de triglicerídeos (MINOKOSHI et al., 2002). Defeitos na sinalização da leptina são associados ao acúmulo preferencial de gordura e comprometimento da β -oxidação no fígado e tecido adiposo (LEE et al., 2001). Deste modo, uma diminuição da ação da leptina leva à esteatose, por deficiência ou resistência dessa adipocina (MEDINA et al., 2004). O aumento da gordura em tecidos extra-adiposos é resultado primário do aumento da lipogênese, embora a diminuição da β -oxidação também contribua para o quadro (ver UNGER e ORCI, 2000). Neste contexto, defeitos na sinalização da leptina acarreta em aumento da expressão de fatores de transcrição lipogênicos, como SREBP-1c e PPAR γ , em fígados e ilhotas pancreáticas (UNGER e ORCI, 2000; LEE et al., 2001). Consistentemente, o tratamento com leptina recombinante de pacientes com lipodistrofia, e níveis reduzidos de leptina, diminuiu todos os parâmetros de doença hepática gordurosa não alcoólica, confirmando o papel da leptina na integridade celular hepática (JAVOR et al., 2005). As ações lipolíticas da hiperleptinemia são associadas com aumento na expressão do PPAR α , da carnitina palmitoil transferase-1 e do coativador -1 α de PPAR γ (PGC1- α), e diminuição da acetil CoA carboxilase no fígado (LEE et al., 2002).

As funções da leptina não se restringem ao controle do apetite. Além dessa função mais evidente, a leptina tem um papel crítico na modulação das respostas imunes inata e adquirida, estabelecendo um link entre o estado nutricional e a resposta imune (ver IIKUNI et al., 2008). A leptina possui propriedades pró-inflamatórias, estimulando a secreção de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-12 (SANCHEZ-MARGALET et al., 2003; SHEN et al., 2005). Na imunidade inata, a leptina pode estimular células dendríticas, monócitos, macrófagos, neutrófilos, entre outras (ver IIKUNI et al., 2008). Por outro lado, a diminuição dos níveis de leptina acarreta em prejuízo no funcionamento da resposta imune (LORD et

al.,1998), e a terapia com leptina reverte essas anormalidades imunológicas (FAROOQI et al., 2002).

Devido ao papel modulador da leptina na inflamação, tem sido especulado um mecanismo comum entre a desregulação imune com a obesidade e os níveis de leptina. Assim, os níveis elevados de leptina em obesos poderiam contribuir para a predisposição desses indivíduos ao desenvolvimento de condições crônicas e doenças degenerativas (IIKUNI et al., 2008). Neste sentido, a leptina tem sido classificada como pró-aterogênica, uma vez que estudos mostraram que defeitos na sua sinalização aumentam a resposta imune regulatória e melhoram a aterosclerose em camundongos LDLr e ApoE *knockout* (TALEB et al., 2007; CHIBA et al., 2008). Em adição, tratamento com leptina exógena promove aterosclerose e trombose em camundongos deficientes da apolipoproteína E (BODARY et al., 2005).

Evidências indicam que a insulina possui papel importante na regulação da expressão da leptina, aumentando a expressão do mRNA da leptina, enquanto a leptina reduz a secreção de insulina no pâncreas e a sua habilidade de regular a utilização de glicose. Isto estabelece um sistema de *feedback* negativo entre insulina e leptina (BARZILAI et al., 1997; SEUFERT, 2004). A leptina também é regulada por hormônios esteroides e tem sido observado um dimorfismo sexual nos níveis da leptina em diferentes espécies (PARDRIDGE, 1986; SAAD et al., 1997). Em humanos, mulheres apresentam níveis maiores de leptina em relação aos homens (SAAD et al., 1997), enquanto que em roedores ocorre o contrário (PARDRIDGE, 1986). A leptina está elevada durante infecções agudas, e em resposta a endotoxinas e citocinas proinflamatórias (SARRAF et al., 1997; BORNSTEIN et al., 1998; FINCK et al., 1998). Por outro lado, exposição ao frio, melatonina e catecolaminas diminuem a leptina (TRAYHURN et al., 1996; LI et al., 1997; DONAHOO et al., 1997; RASMUSSEN et al., 1999).

1.2.2. Resistina

A resistina foi inicialmente descoberta no lavado bronco-alveolar de ratos. O seu nome foi escolhido pelo fato de induzir nos mesmos animais resistência à insulina (STEPPAN et al., 2001). Essa adipocina é considerada um mediador da resistência à insulina e da disfunção metabólica em roedores. Nesses animais a

resistina é secretada pelo tecido adiposo branco (KIM KH et al., 2001) e seus níveis estão elevados tanto na obesidade induzida por dieta quanto em modelos animais de obesidade e diabetes. A administração de resistina exógena ou sua superexpressão diminuem a sensibilidade à insulina (RAJALA et al., 2003). A resistina também age sobre o metabolismo lipídico em camundongos, aumentando os níveis de colesterol total e triacilgliceróis e diminuindo o HDL colesterol (SATO et al., 2005).

Diferente dos roedores, em humanos, a resistina é predominantemente expressa em monócitos e macrófagos (SAVAGE et al., 2001; PATEL et al., 2003). A produção e secreção de resistina por monócitos humanos são aumentadas por estímulos pró-inflamatórios, que por sua vez, aumentam os níveis de leptina circulantes (LU et al., 2002; LEHRKE et al., 2004).

1.3. Lipodistrofia

A obesidade é uma desordem metabólica e nutricional crônica caracterizada por excesso de tecido adiposo (GODFREY, 1971). Nas últimas décadas, com o aumento de sua prevalência, a obesidade tem sido considerada como sendo altamente deletéria, devido a alterações no metabolismo de glicose e lipídeos (VIGOUROUX *et al.*, 2010). Entretanto, a falta de gordura, no contexto das lipodistrofias, também acarreta severas alterações metabólicas incluindo resistência à insulina e dislipidemia, resultando em complicações cardiovasculares prematuras (VIGOUROUX *et al.*, 2010).

As lipodistrofias representam um grupo heterogêneo de doenças, caracterizadas pela perda localizada ou generalizada de gordura corporal (FIORENZA et al., 2011). Pacientes com lipodistrofia podem desenvolver diabetes, dislipidemia, esteatose hepática, acantose *nigricans*, síndrome do ovário policístico e hipertensão (GARG e AGARWAL, 2009).

O tecido adiposo é um órgão com duas funções essenciais, de estoque de energia e endócrina, sendo capaz de sintetizar e secretar hormônios tais como leptina e adiponectina (KERSHAW e FLIER, 2004). Em adição, o tecido adiposo age como um tampão dinâmico para o fluxo pós-prandial de lipídeos (FRAYN, 2002). Na lipodistrofia o tecido adiposo se torna incapaz de tamponar o excesso de lipídeos circulantes e de proteger contra sua toxicidade (FRAYN, 2002), e como

consequência, os ácidos graxos livres permanecem no plasma e são depositados em outros tecidos periféricos como músculo, fígado (PETERSEN et al.,2002; GARG e AGARWAL, 2009), artérias e coração (AL-SHALI e HEGELE, 2004).

Tem sido observado que muitos pacientes obesos com altos índices de massa corporal, chamados de “obesos metabolicamente saudáveis”, são protegidos de doenças metabólicas (BLUHER, 2010). Baseados nisto e em observações de doenças como obesidade e lipodistrofia tem sido proposta a hipótese da “expansibilidade adiposa” (VIRTUE e VIDAL-PUIG, 2008). Esta hipótese considera que o tecido adiposo tem uma capacidade limite de se expandir (SPALDING et al., 2008), determinada por um *set point* que varia nos indivíduos de maneira geneticamente determinada. Nos lipodistróficos, o *set point* de estoque é muito baixo e atingindo rapidamente a capacidade de armazenamento levando aos severos distúrbios metabólicos (VIRTUE e VIDAL-PUIG, 2010) (Figura 2).

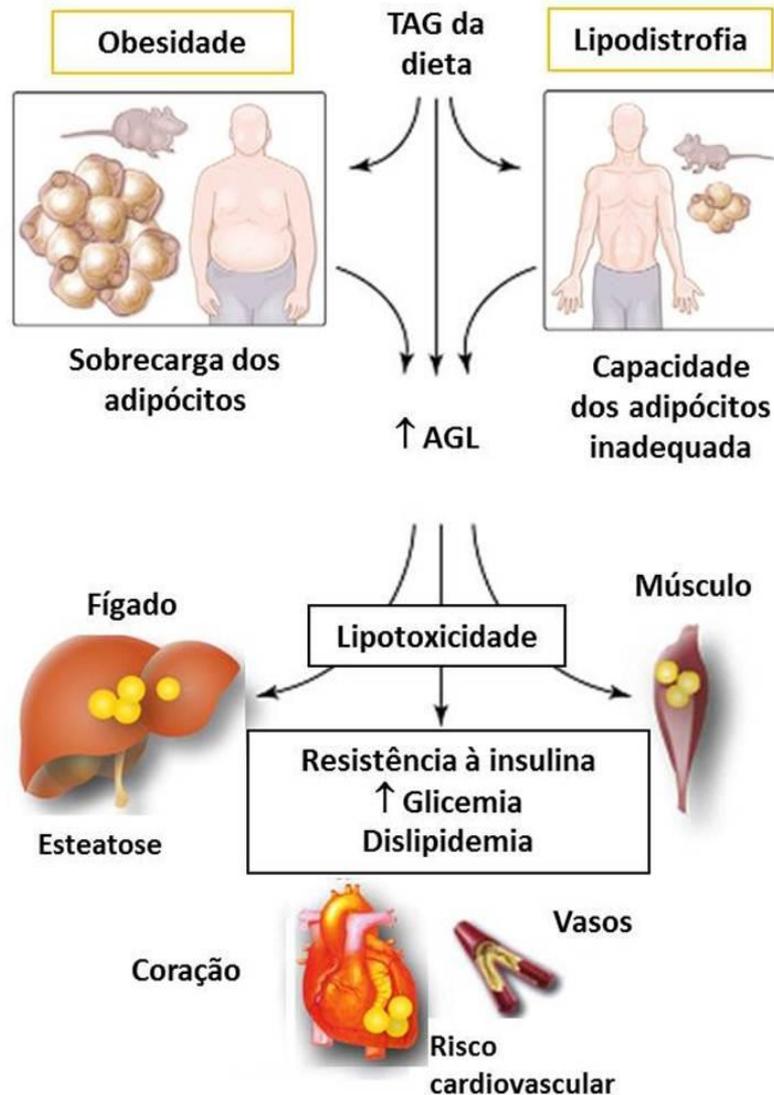


Figura 2. Ilustração esquemática da hipótese da “expansibilidade adiposa”. Esta hipótese propõe que a capacidade do tecido adiposo de acomodar o excesso de triglicerídeos é limitada. A transposição deste limite leva ao acúmulo ectópico de lipídeos e resistência à insulina. Este cenário ocorre tipicamente na obesidade, mas a lipodistrofia é um exemplo de que a capacidade reduzida de tamponamento do tecido adiposo também é caracterizada por severo acúmulo ectópico de lipídeos e resistência à insulina. TAG, triacilgliceróis; AGL, ácidos graxos livres. Adaptado de SAVAGE (2009) e CARON-DEBARLE et al. (2010).

No fígado, a lipodistrofia induz a doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD - *nonalcoholic fatty liver disease*) e resistência hepática à insulina, independentemente de resistência à insulina derivada da gordura visceral (SAVAGE, 2009; PETERSEN et al., 2002). As NAFLD englobam uma gama de

doenças que ocorrem na ausência de abuso de álcool, incluindo desde a simples esteatose, a esteatohepatite não alcoólica e cirrose (MCAVOY et al., 2006).

Além da doença hepática gordurosa não alcoólica, alguns tipos de lipodistrofias podem resultar em aterosclerose, como por exemplo, a lipodistrofia parcial familiar do tipo 3, caracterizada por mutação no gene para PPAR γ (receptor ativado por proliferador de peroxissoma γ) (BARROSO et al., 1999; AGARWAL e GARG, 2002).

1.4. Aterosclerose

A aterosclerose é um processo inflamatório crônico que, geralmente, inicia-se na infância e vai apresentar manifestações clínicas na idade adulta, sendo altamente prevalente em homens e mulheres. As complicações trombo-oclusivas dessa doença, incluindo acidente vascular cerebral e infarto, são as principais causas de morbidade e mortalidade em quase todo o mundo (GOLDSCHMIDT-CLERMONT et al., 2005). A aterosclerose é uma doença multifatorial e progressiva, com fatores ambientais, alimentares, hemodinâmicos, genéticos, dentre outros, fazendo parte da gênese e desenvolvimento desta patologia (ROSS et al., 1993; SCHMITZ et al., 1998).

O processo aterosclerótico se desenvolve como resultado de injúria sustentada à parede arterial, hipótese proposta por Ross et al. (1986). Diversos fatores podem levar a injúria vascular incluindo agentes infecciosos, pressão sanguínea elevada, mediadores inflamatórios e eventos de glicação, todos envolvendo estresse oxidativo (GATTONE et al., 2001; BASTA et al., 2002).

A aterosclerose pode ser considerada uma forma de inflamação crônica resultante da interação entre lipoproteínas modificadas oxidativamente, macrófagos e células T. Tal resposta inflamatória ocorre em estímulo à presença de um agente inflamatório, sendo esse, frequentemente, a LDL oxidada (ROSENSON, 2004; HANSSON e LIBBY, 2006; MALLIKA et al., 2007; CASÓS et al., 2008).

As células T estão entre as primeiras a infiltrar na camada íntima durante os estágios iniciais da aterosclerose. Embora a maioria das células inflamatórias presentes nas lesões sejam macrófagos, aproximadamente 20% destas células são

células T, além de uma pequena proporção de células B, mastócitos e células dendríticas (JONASSON et al., 1986; HANSSON e LIBBY 2006)

As alterações mais precoces causadas pela aterosclerose iniciam-se com o transporte de lipoproteínas para dentro da parede do vaso com bloqueio subsequente dessas em uma malha fibrilar tridimensional do espaço subentodelial (NIVELSTEIN-POST et al., 1991). As células da parede arterial secretam produtos oxidativos de múltiplas vias que podem atingir a LDL bloqueada no espaço subentodelial e iniciar um processo de oxidação lipídica (WITZTUM et al., 1991; PARTHASARATHY et al., 2010).

O acúmulo de LDL oxidada (oxLDL) contribui significativamente para o recrutamento de monócitos circulantes (QUINN et al., 1987; BERLINER et al., 1990). O tratamento de células endoteliais, *in vitro*, com LDL minimamente oxidada (MM-LDL) ativa um fator de transcrição NF κ B-*like* (PARHAMI et al., 1993), o qual induz uma série de genes característicos da resposta inflamatória crônica. Dentre os genes induzidos pelo NF κ B que estão aumentados pela oxLDL incluem o da proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1 ou CCL2, *Chemokine (C-C motif) ligand 2*) (CUSHING et al., 1990) e do fator estimulante de colônia de monócitos (M-CSF) (RAJAVASISTH et al., 1990). As moléculas MCP1/CCL2, então, atraem os monócitos que se ligam às P-selectinas aumentando o rolamento e por fim se aderem firmemente às demais moléculas de adesão, levando à sua migração via endotélio para a camada íntima do vaso (CASÓS et al., 2008). Os monócitos recrutados para a lesão são ativados pelo M-CSF e se convertem em macrófagos que, por sua vez, contribuem para aumentar a oxidação das LDLs (RAJAVASISTH et al., 1990).

Os macrófagos expressam receptores *scavenger* CD36 e SR-A que se ligam às LDLs oxidadas e as fagocitam gerando a formação de células espumosas, devido ao acúmulo de lipídeos nesses macrófagos. Isso ocorre porque não há uma regulação negativa, ou seja, a expressão desses receptores não é regulada pelo conteúdo de partículas captadas (SPARROW et al., 1989; BROWN et al., 1990; MANNING-TOBIN et al., 2009). Assim, dá-se início à formação da estria gordurosa, que constitui a primeira fase da lesão (STARY et al., 1994).

As células espumosas ativadas liberam uma variedade de moléculas quimiotáticas, citocinas e fatores de crescimento (CHILTON, 2004). Dessa forma,

mais linfócitos são atraídos para a lesão ativando um conjunto de moléculas efetoras que expandem e perpetuam a resposta inflamatória (CHILTON, 2004). Monócitos /macrófagos são potentes fontes de fator de crescimento para células do músculo liso vascular (CMLV) e de fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) (ROSS, 1993), explicando em parte, a migração de CMLV que ocorre dentro da lesão. A produção crescente de mediadores inflamatórios aumenta a ligação das LDLs às células endoteliais e a migração de CMLV para a lesão, fazendo com que o processo se torne cíclico (CHILTON, 2004).

As CMLV começam a secretar proteínas de matriz extracelular, colágeno e elastina em excesso formando uma placa fibrosa em torno do núcleo lipídico, estabilizando a estrutura (ROSS, 1993). Essa combinação de acúmulo de lipídeos e produção de colágeno resulta nas formas avançadas complexas de placas ateroscleróticas (KÁDÁR et al., 2001) (Figura 3).

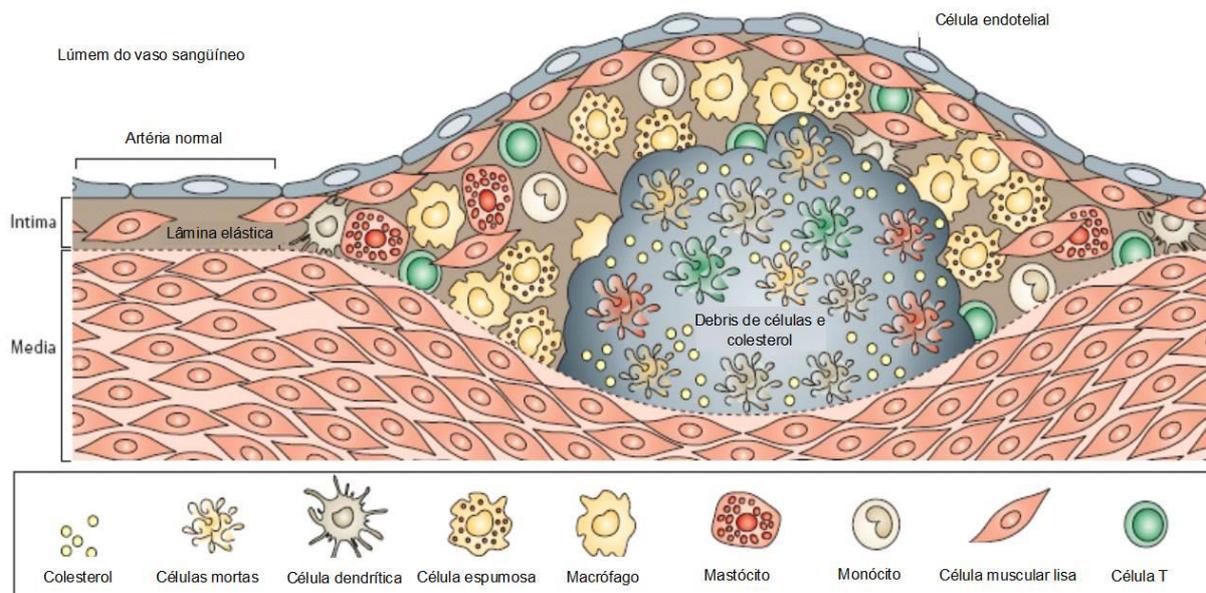


Figura 3 - Composição celular da placa aterosclerótica. O centro da placa aterosclerótica contém lipídeos e detritos de células mortas. Circundando o centro lipídico, a capa fibrosa contém células musculares lisas e fibras de colágeno que estabilizam a placa. Células imunes, incluindo macrófagos, células T e mastócitos são populosos na placa, e estão frequentemente no estado ativado. Estas células produzem citocinas, proteases, moléculas pró-trombóticas e substâncias vasoativas, as quais podem afetar a inflamação da placa e a função vascular. Antes de complicações ocorrerem, o endotélio intacto cobre a placa. Modificado de HANSSON e LIBBY (2006).

A ativação das células T influencia de maneira negativa a estabilidade das placas ateroscleróticas, uma vez que estas células estimulam macrófagos a secretar metaloproteinases, que degradam a capa fibrosa tornando a placa vulnerável à ruptura (GALIS et al., 1994; DOLLERY e LIBBY, 2006). As metaloproteinases de matriz constituem uma família de endopeptidases, produzidas principalmente por macrófagos, células endoteliais e CMLV, atuando por meio de um mecanismo catalítico dependente de zinco (SIASOS et al., 2012).

Em geral, as funções efetoras das células T estão sob rígido controle de uma subclasse de células T, denominadas células T regulatórias (Treg). As células Treg apresentam um papel central na indução ou manutenção da tolerância imunológica, e no término das respostas imunes (CORTHAY, 2009). Em tecidos, estas células são identificadas pela presença do fator de transcrição FOXP3 (Forkhead Box Protein 3) (HORI et al., 2003). Estudos mostram que o aumento no número e na atividade de células Treg reduz o desenvolvimento da aterosclerose (WIGREN et al., 2009; VAN ES et al., 2010). Dessa forma, acredita-se que um importante balanço entre as células T e Treg seja crucial no controle da doença aterosclerótica (SASAKI et al., 2012).

1.5. Doença hepática gordurosa não alcoólica

A doença hepática gordurosa não alcoólica é a mais comum de todas as desordens hepáticas (BYRON e MINUK, 1996; HILDEN et al., 1997). Pesquisas revelaram que 70% dos obesos e 35% dos magros possuem esteatose (WANLESS e LENTZ, 1990). NAFLD é um termo usado para descrever um espectro de doenças que incluem desde a esteatose simples, a esteatohepatite não alcoólica (NASH – *nonalcoholic steatohepatitis*) e cirrose (NEUSCHWANDER-TETRI e CALDWELL, 2003).

Embora a patogênese da NAFLD e sua progressão para a cirrose não esteja completamente elucidada, Day e James (1998) propuseram o modelo “dois *hits*” para descrever uma explicação patofisiológica para o desenvolvimento do dano hepático. Nesse modelo, a esteatose hepática, caracterizada pelo acúmulo de vacúolos cheios de triglicerídeos nos hepatócitos, é considerada o primeiro *hit* da progressão para a NASH. Apesar de considerada uma condição benigna, a

esteatose torna o fígado mais susceptível ao *hit* subsequente, que envolve geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), peroxidação lipídica e inflamação.

A NAFLD é considerada a manifestação clínica da síndrome metabólica, com a presença de resistência à insulina na maioria dos pacientes, na presença ou não de obesidade (DONATI et al., 2004). Entretanto, estudos mostram que a hiperinsulinemia é provável de ser a consequência mais do que a causa da NAFLD, sendo independente de resistência à insulina derivada do tecido adiposo visceral (PETERSEN et al., 2002; JUURINEN et al., 2007). A terapia por 7 meses com insulina exógena em pacientes diabéticos tipo 2, diminuiu significativamente o conteúdo hepático de lipídios (JUURINEN et al., 2007). Além disso, pacientes com lipodistrofia ou lipoatrofia têm grave resistência hepática à insulina, mesmo com tecido adiposo visceral reduzido (PETERSEN et al., 2002).

A resistência hepática à insulina leva a um aumento moderado na concentração plasmática de glicose e estimula a secreção de insulina (SEPPALA-LINDROOS et al., 2002). Essa hiperinsulinemia gera um influxo aumentado e acúmulo hepático de ácidos graxos livres, tanto pelo aumento da lipólise quanto pela lipogênese *de novo* pelo fígado (VANNI et al., 2010). Além disso, pacientes com NAFLD, e consequente resistência hepática à insulina, possuem aumento na produção de VLDL, o que acarreta hipertrigliceridemia e diminuição na concentração de HDL colesterol (RASHID et al., 2003; ADIELS et al., 2006) (Figura 4).

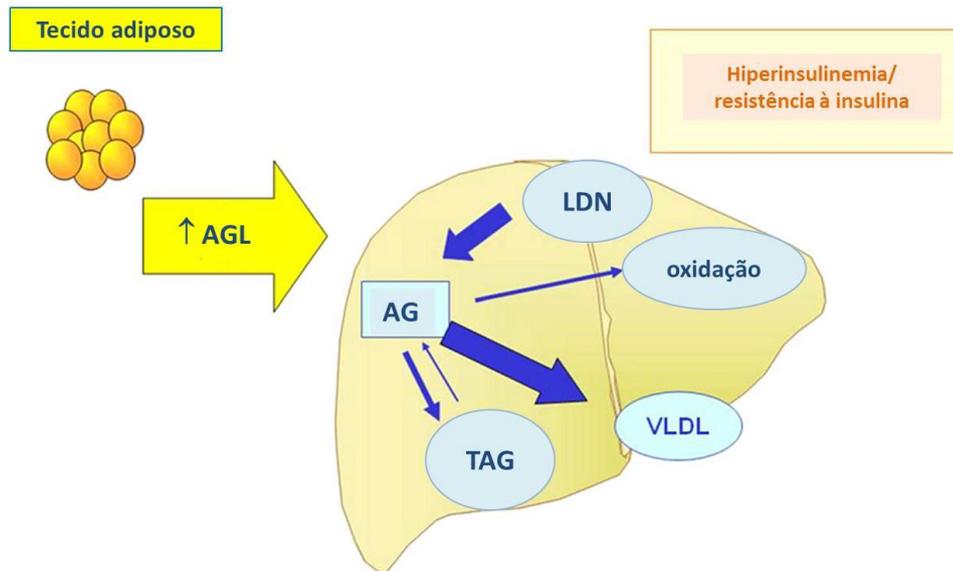


Figura 4. Papel dos ácidos graxos na patogênese da esteatose. Na NAFLD a habilidade da insulina de inibir a lipólise está prejudicada, levando a um aumento do suprimento de AGL para o fígado. A síntese *de novo* de AG é aumentada e a oxidação de AG está *up* regulada, mas o aumento da disponibilidade de AG intra-hepático excede a habilidade do fígado de oxidar o excesso de AG. Por fim, a NAFLD aumenta as taxas de secreção de VLDL, mas com secreção inadequada de apoB100, o que limita a capacidade hepática de exportar TAG. NAFLD, *nonalcoholic fatty liver disease*; AGL, ácidos graxos livres; AG, ácidos graxos; VLDL, *very low density lipoproteins*; LDN, lipogênese *de novo*. Adaptado de VANNI et al. (2010).

O acúmulo de lipídios pelos hepatócitos induz a altas taxas de β -oxidação e produção de espécies reativas de oxigênio ao nível da cadeia respiratória mitocondrial, acarretando toxicidade à organela e subsequente indução de inflamação e fibrose (VIDELA et al., 2004; CHALASANI et al., 2004; ARONIS et al., 2005).

1.6. Receptores nucleares na patogênese da NAFLD e aterosclerose

Receptores nucleares são fatores de transcrição ativados por ligantes que atuam em processos fisiológicos como desenvolvimento, homeostase e metabolismo, através da regulação de genes-alvo (GIGUÈRE, 1999). A superfamília dos receptores nucleares é composta por 48 membros, incluindo os receptores

esteróides, do hormônio tireoidiano e da vitamina D3 (ROBINSON-RECHAVI et al., 2001). Dentro da superfamília dos receptores nucleares, iremos destacar neste trabalho a classe dos receptores órfãos adotados, especificamente o receptor ativado por proliferador de peroxissoma α (PPAR α) e o receptor X do fígado (LXR-*liver X receptor*).

1.6.1. PPAR α

Os receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPARs) são uma subfamília de receptores conhecida por modular diferentes funções celulares, incluindo diferenciação dos adipócitos, metabolismo glicídico e lipídico, e a expressão de genes inflamatórios (SONODA et al., 2008). Dentro da subfamília já foram caracterizados três isoformas de PPARs, conhecidos por α , β , e γ , os quais possuem grande homologia nas sequências de aminoácidos, sendo codificados por genes individuais (ROBINSON-RECHAVI et al., 2001).

O PPAR α é expresso principalmente em tecidos com altas taxas de oxidação peroxissomal e mitocondrial de ácidos graxos, como músculos esquelético e cardíaco, fígado e tecido adiposo marrom (BRAISSANT et al., 1996). Os ligantes naturais do PPAR α incluem ácidos graxos saturados e insaturados, além de eicosanoides e leucotrieno β_4 (VAN RAALTE et al., 2004).

Os genes alvos do PPAR α agem em conjunto de modo a regular o metabolismo lipídico intracelular. Tal receptor nuclear regula a expressão de proteínas envolvidas no transporte, síntese e β -oxidação de ácidos graxos livres, predominantemente no fígado (VAN RAALTE et al., 2004). Essas ações são importantes por prevenirem o acúmulo de ácidos graxos no fígado, e conseqüentemente, a esteatose hepática.

Animais com deleção genética do PPAR α apresentam moderada esteatose sob condições normais, com drástica elevação do grau de acúmulo lipídico no estado de jejum (HASHIMOTO et al., 2000). Pettinelli et al. (2009) mostraram uma redução na expressão do PPAR α em pacientes obesos que apresentavam NAFLD. Além disso, o tratamento com agonista PPAR α , Wy-14,643, reverte a esteatohepatite e fibrose hepática induzida por dieta (IP et al., 2004).

Além dos tecidos já citados anteriormente, o PPAR α também está expresso em células endoteliais, CMLV, monócitos/macrófagos e células T (MARX et al., 2004). Segundo van Raalte et al. (2004) diversos estudos têm mostrado que a ativação do PPAR α reduz a aterosclerose por agir em diversos processos da aterosclerose, como diminuição de citocinas, peptídeos e proteínas envolvidas na vasoconstrição, proliferação de CMLV, ativação de monócitos, trombose e reações inflamatórias. Por outro lado, os estudos com modelos animais ainda são inconclusivos, uma vez que camundongos com deleção tanto do PPAR α quanto da ApoE apresentaram menor grau de lesão aterosclerótica (TORDJMAN et al., 2001).

1.6.2. LXR

Outra subfamília de receptores nucleares da classe dos receptores órfãos adotados são os LXRs. Subdivididos em LXR α e LXR β , esses receptores são conhecidos por estarem envolvidos em muitos processos biológicos e patológicos relacionados ao colesterol e ácidos biliares (ZHAO e DAHLMAN-WRIGHT, 2010). O LXR α é altamente expresso no fígado e em menor grau no tecido adiposo, pulmões, rins, glândulas adrenais, intestino e macrófagos, enquanto o LXR β é mais amplamente expresso (WILLY et al., 1995; SONG et al., 1995).

Oxiesteróis são os ligantes endógenos dos LXRs, que quando ativados, regulam uma série de genes críticos para o efluxo do colesterol, conversão do colesterol em ácidos biliares e excreção biliar (REPA e MANGELSDORF 2002). Estudos mostram que a ativação dos LXRs regula enzimas envolvidas na lipogênese, como ácido graxo sintase e acilCoA carboxilase (JOSEPH et al., 2002; TALUKDAR e HILLGARTNER, 2006). A atuação do LXR sobre o transporte de lipídeos se dá por meio da ativação de enzimas como a lipase lipoproteica (LPL), a proteína de transferência de fosfolípidos, a apolipoproteína E, entre outras (ZHANG et al., 2001; LAFFITTE et al., 2001; CAO et al., 2002). Além disso, os genes induzidos pelo LXR também estão envolvidos na captação de lipoproteínas (YU et al., 2004; ISHIMOTO et al., 2006).

Devido a seu importante papel na regulação de genes envolvidos na homeostase lipídica e resposta inflamatória, o potencial terapêutico do LXR na aterosclerose tem sido extensivamente estudado (JOSEPH et al., 2002 a;

TERASAKA et al., 2003; MICHAEL et al., 2012). Porém, esta estratégia terapêutica deve ser melhor avaliada, uma vez que a ativação do LXR e consequente indução da lipogênese, está associada com aumento dos triglicerídeos plasmáticos e desenvolvimento de esteatose hepática (SCHULTZ et al., 2000; GREFHORST et al., 2002; JOSEPH et al., 2002 a).

1.7. Sistema renina angiotensina

O sistema renina angiotensina (RAS) é o alvo de intensas pesquisas devido ao seu papel essencial na regulação fisiológica da pressão arterial e na homeostase dos fluidos e na patogênese da hipertensão e outras doenças cardiovasculares.

A ativação clássica do RAS inicia com a liberação de renina pelas células justaglomerulares das arteríolas aferentes renais. Na circulação, a renina age sobre seu substrato, liberado pelo fígado, o angiotensinogênio, hidrolisando-o em angiotensina I. A angiotensina I, um decapeptídeo inativo, é então convertida no octapeptídeo biologicamente ativo, a angiotensina II (Ang II), através da remoção de dois aminoácidos C-terminais pela enzima conversora de angiotensina (ECA) (ver CAT e TOUYZ, 2011). Em coração humano, entretanto, a maior parte da conversão da Ang I em Ang II é feita em uma via alternativa, pela enzima quimase (URATA et al., 1990).

A Ang II exerce suas diversas atividades biológicas através da ligação em um dos dois tipos de receptores conhecidos, AT1 e AT2, ambos membros da família de receptores acoplados à proteína G (DE GASPARO et al., 2000). A maioria dos efeitos fisiológicos e patológicos da Ang II são mediados via receptores AT1, incluindo vasoconstrição, secreção de aldosterona, sede, ativação do sistema nervoso simpático, inflamação cardiovascular, hipertrofia, fibrose, entre outras (CAT E TOUYZ, 2011). A ligação da Ang II ao receptor AT2 possui, em geral, efeitos opostos aos mediados pelo receptor AT1, tanto a curto como a longo prazo, provendo um papel protetor (DE GASPARO et al., 2000).

Apesar da Ang II ser considerada o principal produto do SRA, outros Ang-peptídeos também possuem importantes atividades biológicas. A agiontensina-(1-7), Ang-(1-7), é um desses peptídeos ativos que tem sido alvo de inúmeros estudos, especialmente por desempenhar ações mais seletivas que a Ang II e por poder ser

formada por uma via independente da ECA (ver SANTOS et al., 2013). A Ang-(1-7) apresenta-se como o mais pleiotrópico dos metabólitos derivados da Ang II, por exercer efeitos que podem ser idênticos, opostos ou distintos da Ang II (ARDAILLOU, 1997).

A Ang-(1-7) pode ser formada através da clivagem da Ang I por endopeptidases (NEP, 24.11, prolil-endopeptidases) ou diretamente da Ang II por prolil-endopeptidases ou carboxi-peptidases (ver SANTOS et al., 2013). A remoção da fenilalanina do C-terminal da Ang II resulta na formação da Ang-(1-7). Essa conversão é eficientemente catalisada pelo homólogo da ECA, a ECA2 (DONOGHUE et al., 2000; TIPNIS et al., 2000). Em outra via, a Ang I é primeiro hidrolizada pela ECA2 para formar Ang-(1-9) (DONOGHUE et al., 2000), um peptídeo com poucas atividades biológicas conhecidas (OCARANZA, et al., 2010), e então convertida pela ECA ou endopeptidase neutra em Ang-(1-7) (RICE et al., 2004). Santos et al. (2003) reportaram que a Ang-(1-7) é um ligante endógeno do receptor acoplado à proteína G, Mas. O receptor Mas, caracterizado como um receptor oncogene, era conhecido por influenciar a regulação fetal da diferenciação celular e crescimento (HANLEY et al., 1990).

O heptapeptídeo Ang-(1-7), como a Ang II, estimula a liberação de vasopressina no hipotálamo de ratos (SCHIAVONE et al., 1988) e facilita a transmissão noradrenérgica (GIRONACCI et al., 1994). A Ang-(1-7) também está relacionada com o controle do balanço hidroeletrolítico modulando a excreção de água e sódio (SANTOS e CAMPAGNOLE-SANTOS, 1994).

A ligação da Ang-(1-7) às células endoteliais induz vasodilatação por estimular a produção de óxido nítrico (NO), prostaglandinas ou fatores de relaxamento derivados do endotélio (KEIDAR et al., 2007), dependendo da espécie e do leito vascular. Em ratos, a infusão em fmol dessa angiotensina reduz a resistência vascular periférica, débito cardíaco e do volume sistólico, parcialmente atenuados pelo A779 (SAMPAIO et al., 2003). Acredita-se que o efeito vasodilatador desse heptapeptídeo possa ocorrer através da potencialização do efeito vasodilatador da bradicinina (PÖRSTI et al., 1994; LE et al., 1997), além da estimulação do seu receptor específico (FONTES et al., 1994). A Ang-(1-7) promove também a inibição da proliferação de células musculares lisas vasculares (FREEMAN et al., 1996;), inibe o crescimento de miócitos cardíacos (TALLANT et al., 2005), apresenta efeito antitrombótico (KUCHAREWICZ et al., 2000), dentre outros (Figura 5).

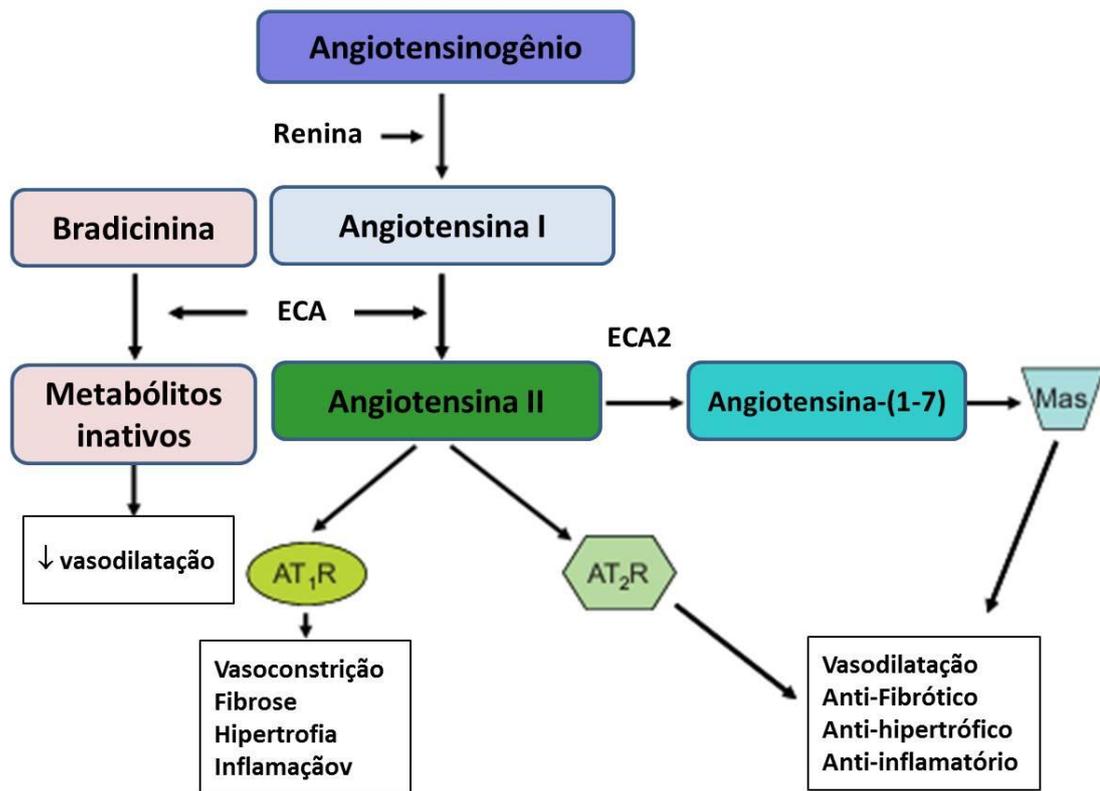


Figura 5. O sistema renina-angiotensina clássico. A renina derivada dos rins é secretada na circulação onde cliva o angiotensinogênio em angiotensina I, que é hidrolisada em angiotensina II (Ang II) pela enzima conversora de angiotensina (ECA). A ECA metaboliza a bradicininina em metabólitos inativos. Uma homóloga da ECA, a ECA2, catalisa a Ang II em Ang-(1-7). A Ang II se liga aos receptores do tipo 1 (AT1R) e do tipo 2 (AT2R) nas células vasculares. A Ang-(1-7) se liga ao receptor Mas e induz efeitos, em sua maioria, contrarregulatórios aos mediados pela Ang II. Adaptado de CAT e TOUYZ (2011).

O entendimento adquirido sobre o papel protetor do eixo contrarregulatório Ang-(1-7)/Mas sobre diversos sistemas do organismo, indica que medidas terapêuticas ativando eixo, são uma estratégia promissora no tratamento das doenças cardiovasculares e outras doenças. Trabalhos do nosso grupo mostraram recentemente que o tratamento crônico de Ang-(1-7), incluída em um composto sacarídico que a protege da passagem pelo trato gastrointestinal, atenua a disfunção e o remodelamento cardíaco de ratos infartados. (MARQUES et al., 2011; MARQUES et al., 2012). Além disso, o agonista Mas, CGEN-856S, produz diminuição da frequência cardíaca e efeitos antiarrítmicos em ratos hipertensos (SAVERGNINI et al., 2010).

1.7.1 Interação do eixo ECA/AngII/AT1 com o metabolismo, esteatose e aterosclerose

Estudos mostram que o SRA além de ser regulado por diversos fatores da síndrome metabólica (NICKENIG et al., 1997; GABRIELY et al., 2001; DAUGHERTY et al., 2004; SIRAGY e HUANG, 2008), ele também atua como regulador das desordens desta síndrome (KINTSCHER et al., 2007; HAYEK et al., 1999; RICHEY et al., 1999). Importantes disfunções metabólicas como a hipercolesterolemia e hiperglicemia modulam a expressão de componentes do SRA em diferentes tipos celulares. Trabalhos têm mostrado que a hipercolesterolemia aumenta a expressão do receptor AT1 em células musculares lisas vasculares (NICKENIG et al., 1997) e as concentrações plasmáticas de angiotensinogênio (AGT) e angiotensina II (Ang II) (DAUGHERTY et al., 2004). Níveis elevados de glicose estimulam a liberação de renina e aumenta a expressão de componentes do SRA em rins, fígado e tecido adiposo (GABRIELY et al., 2001; SIRAGY e HUANG, 2008).

O SRA, por sua vez, contribui para as desordens da síndrome metabólica como diminuição da sensibilidade à insulina e secreção pelas células β , formação de células espumosas e aumento da pressão arterial (PUTNAM et al., 2012). A Ang II pode influenciar o metabolismo do colesterol, de forma limitada sobre seus níveis plasmáticos (KINTSCHER et al., 2007), mas de forma impactante sobre modificações nas propriedades do colesterol (KEIDAR et al., 1996; HAYEK et al., 1999). Evidências indicam que a Ang II aumenta a resistência à insulina (RICHEY et al., 1999), prejudica sua sinalização (SLONIGER et al., 2005) e piora a função pancreática (KAMPF et al., 2005). Além disso, estudos clínicos mostram que o uso de bloqueadores da enzima conversora de angiotensina (ECA) ou bloqueadores do receptor AT1 reduzem a ocorrência de novos casos de diabetes em pacientes hipertensos (BARZILAY et al., 2006, BOSCH et al., 2006).

Diversos estudos apontam a influência do SRA em patologias relacionadas com disfunções metabólicas, como doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) e aterosclerose. Está documentado que a expressão de muitos componentes do SRA, como ECA e o receptor AT1, está aumentada em áreas de fibrose hepática (PAIZIS et al., 2002). A Ang II aumenta a secreção hepática de

citocinas pró-inflamatórias e o estresse oxidativo (BATALLER et al., 2003), contribuindo para a ativação, diferenciação e proliferação das células estelares hepáticas (HSCs – *hepatic stellate cells*) e miofibroblastos (BATALLER et al., 2000).

A infusão sistêmica de Ang II piora a fibrose hepática, enquanto que, a ausência ou bloqueio do receptor AT1, e a inibição da ECA atenuam a progressão das NAFLD durante injúria hepática crônica (JONSSON et al., 2001; BATALLER et al., 2005; KUDO et al., 2009 e NABESHIMA et al., 2009).

A participação do SRA na progressão da aterosclerose já está bem estabelecida. Estudos em vários modelos animais têm mostrado que o bloqueio das ações da Ang II usando inibidores da ECA (MIYAZAKI et al., 1999; GROTHUSEN et al., 2005) ou bloqueadores de AT1 (MIYAZAKI et al., 1999; STRAWN et al., 2000; GROTHUSEN et al., 2005) podem ser efetivos em evitar a progressão da aterosclerose.

A aterosclerose é uma reação inflamatória crônica e diversos estudos demonstraram que o eixo ECA/AngII/AT1 está envolvido em todos os estágios desse processo. A Ang II tem um papel crucial na regulação da resposta inflamatória vascular por ativar o recrutamento de células inflamatórias (KIM et al., 1996; STRAWN et al., 1999). Estudos mostram que essa angiotensina aumenta a expressão de VCAM-1, ICAM-1 e P-selectina dentro da parede vascular e subsequentemente na circulação (GRANINGER et al., 2004). Infusão de Ang II eleva a síntese e níveis de TNF- α , IL-6, e ciclooxigenase-2, os quais agem aumentando a resposta inflamatória (FERRARIO, 2006). Em adição, células inflamatórias podem produzir Ang II, resultando em uma resposta de feedback positivo local, dessa forma perpetuando o ciclo inflamatório (FERRARIO, 2006).

Diversos estudos mostraram que a Ang II causa um aumento na liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs), incluindo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que participam da inflamação. A produção de EROs induzida por Ang II, principalmente pela ativação da NADPH oxidase (GIRENDLING et al., 1994), resulta na inativação química do óxido nítrico (NO), impedindo sua habilidade vasodilatadora e de anti-agregação plaquetária (DAS, 2005). O estresse oxidativo ativado pela Ang II pode contribuir para aumentar a peroxidação lipídica das LDLs (KEIDAR et al., 1996), contribuindo para o acúmulo de lipídios na placa aterosclerótica. Outro efeito parácrino de EROs é a regulação da atividade das metaloproteinases MMP-9 e

MMP-2 (RAJAGOPALAN et al., 1996), importantes na estabilidade e ruptura da placa.

1.7.2. Interação do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas com o metabolismo, esteatose e aterosclerose

Recentemente, os pesquisadores têm realizado esforços na tentativa de compreender melhor o papel do eixo ECA2/angiotensina-(1-7)/Mas nos fatores de risco da síndrome metabólica e em patologias a ela relacionadas. Este eixo tem sido considerado um braço contrarregulatório importante do SRA, por apresentar efeitos opostos àqueles do eixo ECA/Ang II/ AT1.

Trabalhos anteriores do nosso grupo mostraram que a deleção do receptor Mas induz um quadro semelhante à síndrome metabólica em camundongos FVB/N (SANTOS et al., 2008). Além disso, aumento nos níveis circulantes da Ang-(1-7) induzem redução na lipídemia, melhora na resistência à insulina e aumento na captação de glicose pelos adipócitos (GIANI et al., 2009; SANTOS et al., 2010; LIU et al., 2012). A Ang-(1-7) age, através do receptor Mas, beneficemente fosforilando e modulando mediadores da sinalização da insulina, como AKT, GSK-3 β e AS-160 (MUÑOZ et al., 2012).

Estudos mostraram que em modelos animais de fibrose hepática ocorre uma *upregulation* tanto da Ang-(1-7) como da ECA2, como forma de contrarregular as ações da Ang II (HERATH et al., 2007; LUBEL et al., 2009; HUANG et al., 2010). Animais knockout para a ECA2 apresentam fibrose hepática espontaneamente e o tratamento com a enzima recombinante atenua a fibrose experimental (OSTERREICHER et al., 2009). Também já foi demonstrado que o bloqueio farmacológico do receptor Mas piora a fibrose hepática, sugerindo um papel protetor da Ang-(1-7) nesta patologia (PEREIRA et al., 2007).

O papel do eixo contrarregulatório do SRA sobre a aterosclerose foi mostrado recentemente com a estimulação da via pela superexpressão da ECA2 ou com o bloqueio através da deleção da ECA2 em camundongos ApoE^{-/-} (DONG et al., 2008; LOVREN et al., 2008; THOMAS et al., 2010). O tratamento da aterosclerose utilizando Ang-(1-7) foi avaliado por Tesanovic et al. (2010), os quais observaram uma significativa melhora na função endotelial e ateroproteção em modelo de

aterosclerose. Contudo, neste trabalho, não foi possível concluir sobre qual (is) receptor estes resultados eram mediados, uma vez que os efeitos da Ang-(1-7) foram bloqueados por antagonistas dos receptores AT2 e Mas. Até o momento nenhum estudo foi conduzido utilizando a deleção do receptor Mas em modelo animal de aterosclerose. Atualmente, não se tem conhecimento sobre trabalhos que demonstrem alguma interação entre o SRA e as lipodistrofias.

1.8. Modelos de camundongos com deleção gênica: Mas e ApoE

O protooncogene Mas foi primeiramente detectado em células tumorais em 1986, mas sua função direta não foi definida por mais de uma década (YOUNG et al., 1986). Somente depois da geração de camundongos com deleção do protooncogene Mas (Mas-KO) a partir dos *backgrounds* C57Bl/6 e FVB/N em 1998 (WALTHER et al., 1998) foi possível descobrir qual o ligante específico do Mas e estudar a importância fisiológica dessa proteína.

Neste modelo, o contrário do resultado obtido com a Ang II, a ligação da Ang-(1-7) em fragmentos de rins foi abolida (SANTOS et al. 2003). Além disso, o camundongo deficiente para o Mas não apresenta as ações antidiuréticas da Ang-(1-7) após a sobrecarga hídrica (SANTOS et al. 2003). Estudos *in vitro* confirmaram que a Ang-(1-7) é o ligante específico do Mas, uma vez que a ligação do peptídeo em células transfectadas pelo Mas provoca a liberação de ácido aracdônico (SANTOS et al. 2003). Esses achados identificaram o Mas como o receptor funcional do heptapeptídeo Ang-(1-7).

A princípio, não foram encontradas diferenças significativas da pressão arterial ou da frequência cardíaca nos animais Mas-KO, machos e fêmeas, com *background* C57BL/6 (WALTHER et al., 1998). Entretanto, foi observado uma grande redução da variabilidade da frequência cardíaca em fêmeas, e um aumento da variabilidade da pressão arterial nos camundongos machos (WALTHER et al., 1999). Corações isolados de camundongos Mas-KO tratados com A-779 apresentaram uma diminuição da contratilidade e frequência cardíaca (CASTRO et al. 2006).

Os camundongos FVB/N com deleção do receptor Mas apresentaram pressão arterial elevada quando avaliada por telemetria e disfunção endotelial (XU et al. 2008). Em trabalhos anteriores do nosso grupo, o Mas-KO com *background* FVB/N

foi caracterizado como modelo de síndrome metabólica, apresentando alterações no metabolismo lipídico e glicídico (SANTOS et al., 2008), e resposta alterada das ações da insulina em adipócitos (MARIO et al., 2012).

Muitos estudos sobre a aterosclerose têm sido realizados em diferentes modelos animais, particularmente, em camundongos geneticamente modificados. Isso porque, com exceção do background C57BL/6, os camundongos são altamente resistentes ao desenvolvimento de lesões ateroscleróticas (JAWIEN et al., 2004). Mesmo nesse background, as lesões desenvolvem-se apenas sob dietas não fisiológicas, com altas quantidades de gordura e suplementação com ácido fólico, fornecidas por longos períodos. Esse tipo de modelo experimental apresenta desvantagens, como o pequeno tamanho, localização e estágio das lesões (JAWIEN et al., 2004).

De acordo com as circunstâncias citadas acima, foi necessária a criação de modelos que desenvolvessem aterosclerose através da deleção de genes críticos no metabolismo do colesterol e aterogênese (MEIR e LEITERSDORF, 2004). Dessa forma, em 1992 dois grupos individuais desenvolveram um modelo de aterosclerose através da inativação do gene da ApoE (PLUMP et al., 1992; PIEDRAHITA et al., 1992). A apolipoproteína E, uma glicoproteína sintetizada principalmente no fígado e cérebro, é um constituinte de todas as lipoproteínas com exceção da LDL. A ApoE age como ligante para receptores que removem remanescentes de quilomícrons e de VLDL. Essa apolipoproteína pode ser sintetizada também em monócitos e macrófagos, com efeitos locais sobre a homeostase do colesterol e reações inflamatórias em vasos ateroscleróticos (CURTISS e BOISVERT, 2000).

Devido às ações da ApoE no transporte de lipídios endógenos e provenientes da dieta, e sobre o transporte reverso do colesterol, o camundongo deficiente da ApoE (ApoE-KO) possui a habilidade de remoção de lipoproteínas plasmáticas prejudicada (PLUMP e BRESLOW, 1995). Os camundongos ApoE-KO são caracterizados por espontânea hiperlipidemia e aterogênese, com níveis de colesterol total > 500 mg/dL, mesmo sob dieta comercial (PLUMP et al., 1992; PIEDRAHITA et al., 1992). O aumento no colesterol total não sofre alterações quanto ao gênero ou idade dos animais. Apesar deste aumento, o HDL colesterol encontra-se diminuído, enquanto os triacilgliceróis estão aproximadamente 68% elevados em relação aos controles (JAWIEN et al., 2004).

Uma característica importante observada nos camundongos com deleção da ApoE é a redução no tecido adiposo, sob dieta comercial e dieta diabetogênica, quando comparado aos controles (HUANG et al., 1998). Da mesma maneira, camundongos ApoE-KO no *background* ob/ob são resistentes aos ganho de peso e obesidade induzidos por dieta hiperlipídica (HOFMANN et al., 2008). Essas características são provocadas pela redução da atividade da LPL e consequente prejuízo no *clearance* de triacilgliceróis observados nestes animais (HUANG et al., 1998)

Dansky et al. (1999) reportaram pela primeira vez, que o *background* genético é o principal efector na susceptibilidade à aterosclerose em camundongos ApoE-KO. Segundo os autores, o ApoE-KO-C57BL/6 é mais bem mais susceptível ao desenvolvimento de lesões do que o *knockout* ApoE em camundongos FVB/N. Dessa forma, em nosso trabalho desenvolvemos um modelo duplo-*knockout* para o receptor Mas e para a ApoE (DKO), ambos com *background* C57BL/6.

A importância da ApoE na manutenção da homeostase do colesterol não se limita à circulação periférica, uma vez que ela possui um papel importante nos fenômenos neurológicos, como plasticidade neuronal e sinaptogênese (HAUSER et al., 2011). O colesterol provindo das lipoproteínas contendo ApoE e liberado para os neurônios, aumenta a formação das sinapses por promover a biogênese das vesículas sinápticas e regular a maquinaria necessária para sua liberação (THIELE et al., 2000). A ApoE é também essencial para o *clearance* e redistribuição de colesterol durante a regeneração de nervos (LEBLANC e PODUSLO, 1990). Neste contexto, estudos têm indicado a participação da ApoE no envelhecimento e na doença de Alzheimer (MAHLEY e RALL, 2000; HERZ e BEFFERT, 2000). O camundongo com deleção da ApoE apresenta um prejuízo na memória e no aprendizado espacial, acompanhados de déficit colinérgico (GORDON et al., 1995). Além disso, estes animais são mais susceptíveis à neurodegeneração quando comparados aos WT (WALKER et al., 1997).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Para realização dos experimentos foram utilizados animais controles Wild Type C57BL/6 (WT), com deleção do receptor Mas (Mas-KO), da apolipoproteína E (ApoE-KO), e o duplo-knockout Mas/ApoE (DKO), com aproximadamente 20 semanas de idade. Os camundongos foram provenientes do Biotério de Camundongos Transgênicos do Laboratório de Hipertensão, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). As matrizes da linhagem ApoE-KO foram oriundas do Biotério Ênio Cardillo Vieira do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Para gerar os camundongos DKO, as linhagens simples Mas-KO e ApoE-KO foram cruzadas por gerações sucessivas, e tiveram a identidade genética confirmada por genotipagem de fragmento de cauda, a cada geração.

Todos os camundongos tiveram livre acesso à ração e água, e foram mantidos em gaiolas coletivas, em ambiente com ciclos de luminosidade de 12 horas (7:00 às 19:00 h) com temperatura variando entre $25 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFMG (CETEA/UFMG): nº do protocolo 139/11.

4.2. Genotipagem

Para confirmação da deleção do receptor Mas e da ApoE nos animais Knockout foi realizada a extração do DNA genômico seguido de PCR.

4.2.1. Extração do DNA genômico

Cada animal foi identificado e em seguida cortou-se um pequeno pedaço da ponta de sua cauda. Em um microtubo foram adicionados 100 μl de tampão com 10 μl de proteinase-K na concentração de 20mg/mL, juntando-se ao tecido coletado. Incubou-se o produto à temperatura de 55°C por duas horas, ou até que tivesse ocorrido total digestão do tecido. Em uma próxima etapa, adicionou-se 750 μl de

tampão Tris-EDTA 1X, e incubou-se novamente a amostra por 10 minutos à temperatura de 95°C. Do produto final foram utilizados 2 µl para realização do PCR.

4.2.2. PCR e detecção de produtos amplificados em gel de agarose

Foram utilizados primers específicos para o DNA do receptor Mas e da ApoE de camundongos. Análises dos pares de bases foram executadas através do programa específico BLASTN, sintetizados pela empresa Phoneutria® e aliquotados na concentração de 150 µM e guardados em freezer a -20°C. Uma subsequente diluição para 10 µM foi necessária. A amostra da etapa anterior (2 µl) foi utilizada como fita molde para a amplificação por PCR. Todas as reações foram realizadas num volume final de 50 µl em tubos resistentes a temperaturas elevadas (Hot start) com os seguintes reagentes: 1 µL (10 µM) de cada primer (sense e anti-sense), tampão para PCR (concentrações finais: Tris-HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM), 2 µl de MgCl₂ 50mM, dNTPs (Deoxinucleotídeos trifosfato-: dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 0,2 mM) e 2,5 UI de Taq DNA polimerase.

Para o processo de ciclagem térmica, realizou-se desnaturação inicial por 4 minutos a 94°C seguida de 35 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu de desnaturação por 30 segundos a 94°C, anelamento por 30 segundos a 59°C (para o primer Mas) e 68°C (para o primer ApoE) e extensão por 1 minuto a 72°C.

As amostras foram incubadas por um período adicional de 10 minutos a 72°C (extensão final) após o término do último ciclo. Realizou-se também PCR em água estéril para avaliação de possível contaminação (branco). Uma alíquota de 8 µL de cada amostra foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio (0,64 µg/mL). As bandas de amplicons foram visualizadas em transiluminador (Gene Genius, Syngene, USA) sob luz ultra-violeta para verificação da presença ou ausência de amplificação. O peso molecular dos produtos da PCR foi determinado pela comparação com um marcador de massa molecular.

4.3. Peso corporal e peso de órgãos

Para determinação do peso corporal os animais foram pesados logo antes dos experimentos. Após a eutanásia dos animais, os órgãos (fígado, coração e tecido

adiposo epididimal) foram extraídos e pesados. Em seguida, os tecidos foram armazenados em tubos Eppendorf® e rapidamente congelados em gelo seco. As análises dos pesos dos órgãos foram realizadas pelo peso específico (razão peso do órgão pelo peso corporal).

4.4. Amostras de sangue

Após jejum de 10 a 12 horas as amostras de sangue foram retiradas, por exangüinação via artéria femoral, em microtubos, após aplicação de anestesia intraperitoneal de uma solução de ketamina (130mg/kg) e xilazina (0,3mg/kg). O soro foi separado por centrifugação a 3500 rpm (1301 rcf) por 10 minutos, em centrífuga de mesa (Eppendorf® 5417R).

4.5. Avaliação do perfil lipídico

O perfil lipídico foi avaliado por meio da quantificação dos níveis bioquímicos séricos do Colesterol total (CT) (Labtest Diagnóstica®, Brasil), HDL-colesterol (Bioclin®, Brasil) e Triglicerídeos (Labtest Diagnóstica®, Brasil). Os testes foram realizados conforme as orientações dos fabricantes dos kits comerciais. A fração aterogênica foi obtida pela diferença entre CT e HDL, e o índice aterogênico foi obtido pela razão entre CT e HDL. Todos os ensaios foram adaptados para microplacas de 96 poços e lidos em leitor de microplaca Biotek Synergy HT.

4.6. Verificação do perfil lipídico hepático

Os lipídeos totais hepáticos foram extraídos com o uso de solventes orgânicos de acordo com o método de Folch et al. (1957). Aproximadamente 100mg de fígado foram triturados utilizando-se homogeneizador (IKA T10 basic, SP, Brasil), durante um minuto, com 1900µL de solução de clorofórmio:metanol (2:1). Em seguida, adicionou-se 400µL de metanol aos tubos, seguido de centrifugação por 10 minutos a 3.000rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de ensaio com peso conhecido e posteriormente acrescido 800µL de clorofórmio e 640µL de solução de NaCl a 0,73%. Após nova centrifugação por 10 minutos a 3.000rpm, foi desprezada

a fase superior. A parede interior de cada tubo foi lavada três vezes com 600µL de solução de Folch (3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água e 2% de NaCl a 0,29%). Após cada lavagem, a fase superior foi descartada. Os extratos lipídicos obtidos foram secados em estufa overnight a 37°C, e os lipídeos quantificados gravimetricamente.

Em seguida, os lipídeos foram ressuspensos em 500µL de isopropanol para a determinação dos níveis de CT e triglicerídeos. Para as dosagens do CT e triglicerídeos no extrato lipídico, seguiu-se o método enzimático anteriormente mencionado.

4.7. Avaliação da glicemia

Para avaliação da glicemia dos animais, foram dosados os níveis de glicose plasmática antes da anestesia dos animais através da utilização do glicosímetro portátil Optium Xceed® (Abbot Laboratories, USA). A coleta do sangue capilar foi realizada através de um pequeno corte na cauda, cotejando-se o sangue diretamente na fita teste.

4.8. Determinação dos níveis séricos de leptina, insulina, resistina e CCL2

Os níveis séricos de leptina (Millipore®, USA) e CCL2 (R&D Systems, Minneapolis, MN) foram avaliados utilizando kits de ELISA específicos, de acordo com as especificações do fabricante. Os níveis séricos de resistina e insulina (Milliplex- Merck Millipore®, USA) foram determinados utilizando a tecnologia xMAP® de leitura de *beads* magnéticos através do equipamento *Luminex 200* (Novagen ®).

4.9. Avaliação da função hepática

A determinação da atividade da enzima alanina aminotransferase (ALT) foi realizada conforme as orientações do fabricante do kit comercial (Bioclin®, Brasil), com adaptação para microplacas de 96 poços e lidos em leitor de microplaca Biotek Synergy HT.

4.10. Peroxidação lipídica hepática: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para avaliar a peroxidação lipídica, procedeu-se a determinação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico no tecido hepático dos animais.

A formação de malondialdeído (MDA), resultante da quebra de ácidos graxos poli-insaturados, é um conveniente índice para se determinar o grau de peroxidação lipídica. O ácido tiobarbitúrico reage com o MDA, formando um aduto na proporção de 2:1, sendo este detectado espectrofotometricamente a 535nm.

A determinação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada segundo o método descrito por Buege e Aust (1978). Para tal, o homogenato do fígado foi obtido triturando-se 100mg de tecido em 1mL de PBS (pH = 7,4). Uma alíquota de 500 μ L do homogenato foi misturada a 1mL da solução de ácido tricloroacético 15% (p/v), ácido tiobarbitúrico 0.38% (p/v) e HCl a 0.25N. A mistura foi aquecida em banho-maria fervente por um período de 15 minutos. Após resfriamento em água corrente, adicionou-se 1,5mL de butanol, para extração do cromóforo, e a mistura foi centrifugada a 3.000 rpm por 10 minutos. A absorbância do sobrenadante foi lida a 535nm e o resultado foi normalizado por dosagem de proteínas pela técnica de Bradford (1976), segundo o qual a concentração de proteínas nas amostras é calculada através de uma curva padrão, feita com albumina.

4.11. Histologia do tecido hepático

O tecido hepático foi fixado em Bouin por 24 horas, desidratado e incluído em blocos de paraplast®. As lâminas com cortes de 4,5 μ m espessura foram coradas pelo método HE (hematoxilina-eosína). A coloração de Sudam IV foi realizada em cortes congelados de 10 μ m de espessura. As lâminas foram avaliadas por um patologista alheio à origem do material.

4.12. Extração de proteínas totais

Para a extração de proteínas totais os tecidos, previamente removidos e estocados no freezer -80°C , foram homogeneizados em 200 μl de tampão de lise (1% Triton X-100, 0,15M NaCl, 20mM de Tris HCl, pH 7.0, 1mM MgCl_2 , 1mM CaCl_2 , 4 $\mu\text{g/ml}$ de leupeptina, 4 $\mu\text{g/ml}$ de aprotinina, 1mM de orthovanadato de sódio, 0,5 mM PMSF). Após centrifugação as amostras foram incubadas sobre o gelo por 30 minutos e em seguida o lisado foi coletado e centrifugado a 14000 rpm por 20 minutos a 4°C em uma centrífuga Eppendorf modelo 5417R. O sobrenadante foi coletado, e a concentração das proteínas totais determinada em espectrofotômetro pelo método de Bradford (1976).

4.13. Western Blotting

Setenta μg dos extratos protéicos foram fracionados em gel de poliacrilamida/SDS 10% a 100V por 2h. Após a corrida eletroforética as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Em seguida as ligações não específicas foram bloqueadas com TBS-T 1x (Tris-Base 1M 1x, pH 7,6 contendo 0,1% de Tween), contendo 5% de leite em pó desnatado. Após o bloqueio as membranas foram incubadas com anticorpo primário diluído em TBS-T 1x, por 18 horas a 4°C . Foram utilizados os seguintes anticorpos primários comerciais: rabbit polyclonal Anti- α -Insulin Receptor Antibody, β subunit (1:1000; Millipore®, MA, USA); mouse monoclonal Anti-LXR alpha (1:1000, Abcam®, MA, USA); rabbit polyclonal Anti-PPAR alpha (1:1000, Abcam®, MA, USA); rabbit polyclonal Anti-Glycogen Phosphorylase (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e rabbit polyclonal Anti-Glucose-6-Phosphatase α (1:1000 Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). As membranas foram então lavadas três vezes com TBS-T 1x e incubadas 1 hora com o anticorpo secundário fluorescente Goat – Anti- Rabbit ou Goat -Anti-mouse IRDye® 680 CW (LI-COR Biosciences, USA) diluído em TBS-T 1x. Após este tempo as membranas foram lavadas mais três vezes com TBS-T 1x e escaneadas no aparelho LI-COR Odyssey (Uniscience, USA). O resultado foi normalizado pela β -actina (mouse monoclonal Anti- β -Actin, 1:2000, Sigma®, Missouri, USA).

4.14. Real time RT-PCR

O mRNA total da aorta abdominal e baço foram isolados com Tri-reagente (MRC Inc.). A transcrição reversa foi realizada usando o kit ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI) de acordo com as instruções do fabricante. O Real-time PCR (StepOne Plus, Applied Biosystems) foi realizado com o Mix ABsolute™ QPCR (ABgene). Primers e sondas específicos (Tabela 1) foram usados para determinar a expressão de diferentes marcadores de subtipos de linfócitos T helper (Th) (Th1: Tim3, Ifng; Th2: Gata-3, Il4; Treg: Foxp3, Il10; Th17: Rorc, Il17) e de HPRT (controle endógeno). Os níveis do mRNA foram calculados pelo método comparativo Ct. A medida dos valores de Ct foi primeiro normalizada pelo controle interno HPRT, calculando o delta Ct (ΔCt), obtido pela subtração dos valores do Ct de HPRT do valor de Ct do gene de interesse. Um delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) foi calculado subtraindo-se a média dos ΔCt s do grupo controle (ApoE-KO) dos valores de ΔCt do grupo de estudo (DKO). O $\Delta\Delta Ct$ foi plotado como a variação relativa ao controle com a seguinte fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tabela 1. Primers e sondas usados para real-time PCR.

Gene	Função	Sequência	Tamanho (pb)	Número de acesso
Foxp3	FW	5'- GGCCCTTCTCCAGGACAGA -3'	112	NM_054039
	RV	5'- GCTGATCATGGCTGGGTTGT -3'		
	Sonda	5'- FAM- <i>ACTTCATGCATCAG</i> CTCTCCACTGTGGAT-TAMRA -3'		
Gata3	FW	5'- CAGAACCGGCCCTTATCA -3'	115	NM_008091
	RV	5'- CATTAGCGTTCTCCTCCAGA -3'		
	Sonda	5'-FAM-CGAAGGCTGTCGGCA- TAMRA -3'		
Havcr2 (Tim3)	FW	5'- GCCGGTGGACCTCAGTTTC -3'	69	NM_134250
	RV	5'- TGGGAGCCAGCACAGATCA -3'		
	Sonda	5'-FAM-ACAGCTGCCTGCCAGTGCCC- TAMRA -3'		
IFNγ	FW	5'- TGAGTATTGCCAAGTTTGAGGTCA -3'	77	NM_008337
	RV	5'- GTGGACCACTCGGATGAGCT -3'		
	Sonda	5'- FAM-CCACAGGTCCAGCGCCAAGCA- TAMRA -3'		
Il4	FW	5'- CAACGAAGAACACCACAGAGAG -3'	89	NM_021283
	RV	5'- GCATGGAGTTTTCCCATGTT -3'		
	Sonda	5'- FAM- AGCTCGTCTGTAGGGCTTCCAAGGT - BHQ1 -3'		
Il10	FW	5'- TTTGAATTCCCTGGGTGAGAA -3'	73	NM_010548
	RV	5'- ACAGGGGAGAAATCGATGACA -3'		
	Sonda	5'- FAM-TGAAGACCCTC AGGATGCGGCTG-TAMRA -3'		
HPRT	FW	5'- GACCGGTCCCGTCATGC -3'	66	NM_013556
	RV	5'- TCATAACCTGGTTCATCATCGC -3'		
	Sonda	5'- FAM-ACCCGCAGTCCCAGCGTCGTG- TAMRA -3'		

4.15. Avaliação da aterosclerose

4.15.1. Área de lesão na aorta e válvula aórtica

Para avaliação da deposição lipídica, cada aorta foi cuidadosamente retirada, dissecada removendo toda a adventícia a partir da válvula aórtica até a bifurcação ilíaca, abertas longitudinalmente e fixadas *overnight* com solução de formol-sacarose (4% paraformaldeído, 5% de sacarose, 20 μ mol/L de BHT, e 2 μ mol/l EDTA, pH 7,4) a 4^oC. Depois de fixadas, as aortas foram submetidas a uma solução a 70% de etanol durante cinco minutos para desidratação e, posteriormente, coradas por 10 minutos sob agitação em uma solução filtrada contendo 0,5% de Sudan IV, 35% de etanol e 50% de acetona. Em seguida, as aortas foram descoradas por cinco minutos em solução de etanol 80%, de maneira que apenas as placas de gordura permanecem coradas, devido à afinidade do Sudan IV por lipídeos (Palinski *et al.*, 1994). As imagens das aortas foram capturadas por scanner e digitalizadas em computador. O programa analisador de imagens Image-Pro Plus versão 6.3 (Image-Pro Plus Software, Bethesda Maryland - USA) foi utilizado para obtenção das medidas. As análises das imagens foram realizadas por um segundo observador, considerando para o cálculo a porcentagem da lesão em relação à área total da aorta.

A região da válvula aórtica foi primeiramente fixada em solução de formol 10% por cinco horas e, em seguida, transferida para uma solução de sacarose a 30% em salina fisiológica por 24 horas, para desidratação do tecido. O tecido foi incluído em Tissue Freezing Medium (Jung *Tissue Freezing Medium*; Leica Microsystems, Wetzlar - Germany) e cortado em criostato (secções de 10 μ m). Os cortes foram corados com Sudan IV e contra-corados com hematoxilina. Esse material foi examinado por um segundo observador e submetido à análise morfométrica das lesões. Para isso, foram selecionados 10 cortes, amostrando uma extensão média de 250-300 μ m, com as estruturas anatômicas referenciais da válvula aórtica, que foram fotografados (aumento de 10x) e a medida das áreas de lesão feita com o auxílio do software analisador de imagens Image-Pro Plus versão 6.3 (Image-Pro Plus Software, Bethesda Maryland - USA). O cálculo da lesão média/animal foi feito

somando-se todas as medidas dos 10 cortes, representando o valor da área da lesão.

4.15.2. Imunohistoquímica

A região da válvula aórtica foi cortada em secções transversais em série de 5 µm, como previamente descrito (MONTECUCCO et al., 2011). Os cortes foram fixados em acetona e marcados com os anticorpos específicos: *anti-mouse* CD68 (macrófagos, 1:400; ABD Serotec, Dusseldorf, Germany), *anti-mouse* CD3 (linfócitos, 1:10; BD Pharmingen™, Franklin Lakes, NJ), *anti-mouse* Ly-6B.2 (neutrófilos, 1:50; ABD Serotec), *anti-mouse* MMP-8 (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), *anti-mouse* MMP-9 (1:60; R&D Systems), e *anti-mouse alpha-smooth muscle actin* (CMLV, 1:200, Progen, Heildeberg, Germany). A quantificação foi realizada com o software MetaMorph. Os resultados foram calculados como porcentagem da área corada pela área total de lesão ou número de células infiltradas por mm² de área de lesão.

4.15.3. Avaliação da deposição de colágeno na válvula aórtica

Para avaliação da deposição de colágeno, os cortes da válvula aórtica foram corados com Picro sirius. Cinco cortes por seio aórtico foram lavados com água e incubados com Sirius Red 0,1% (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) em ácido pícrico saturado por 90 minutos. Os cortes foram lavados 2 vezes com HCL 0,1N por 1 min e então imersos em água. Em seguida, as secções foram desidratadas com etanol por 30 segundos. Os cortes foram fotografados com configurações idênticas de exposição e a medida das áreas de colágeno feita pela quantificação da coloração em tom avermelhado com o auxílio do software analisador de imagens MetaMorph. Os dados foram calculados como porcentagem de colágeno por área total de lesão.

4.16. Ultrassonografia de alta resolução

Todos os animais foram submetidos a Ecocardiografia de alta resolução

utilizando aparelho Vevo 2100 (Visual Sonics). Após indução anestésica com Isoflurano 2,5 % (Cristália®), foi realizada remoção química dos pêlos do tórax e abdômen, utilizando o removedor Nair (Church & Dwight Canada Corp®). A anestesia foi mantida com Isoflurano entre 1% e 1,5% de forma que a frequência cardíaca fosse mantida em torno de 400 batimentos por minuto. Em todos os experimentos foi utilizado um transdutor mecânico de 40 MHz. A penetração máxima deste transdutor é 1,2 cm com uma resolução de 30 µm, operando a uma taxa de frame de 32 Hz.

Para realização do exame ultrassonográfico foi utilizado gel para transmissão ultrassônica. Para visibilizar a aorta ascendente, arco aórtico e vasos do pescoço, foi utilizada uma visão de eixo longo paraesternal direita. Nesta visão foram tomadas medidas do diâmetro interno da raiz da aorta e da aorta ascendente em sístole e diástole. Uma visão paraesternal de eixo curto foi realizada para visualização de um corte transversal da aorta ascendente imediatamente anterior à saída da artéria inominada. Através desta imagem foram feitas medidas da espessura da íntima-média (IMT) da aorta. Avaliações funcionais e dimensionais foram realizadas *offline* com as imagens geradas em modo M e bidimensional com a gravação de CINE loops da visão paraesternal esquerda, eixos curto e longo do coração. Foram tomadas medidas do diâmetro interno do ventrículo esquerdo, volume do ventrículo esquerdo, volume de ejeção, fração de encurtamento, fração de ejeção, débito cardíaco e relação E/A do enchimento ventricular esquerdo.

Todos os exames foram realizados por um único operador que desconhecia a identidade dos animais.

4.17. Análise estatística

Os resultados foram expressos com médias \pm EPM. A comparação entre os grupos foi feita utilizando-se ANOVA one-way seguido de post hoc de Newman-Keuls quando apropriado. Comparações entre 2 grupos foram realizadas através de teste T de Student não pareado. Os cálculos e análises estatísticas foram realizados utilizando-se o programa Graph Pad Prism® 5.0 (San Diego, CA, USA), sendo consideradas diferenças significativas para $p < 0.05$.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIELS, M.; TASKINEN, M.R.; PACKARD, C.; et al. Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. **Diabetologia**, 49(4):755-65, 2006.

AGARWAL, A.K.; GARG, A. A novel heterozygous mutation in peroxisome proliferator-activated receptor- γ gene in patient with familial partial lipodystrophy. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 87(1):408-411, 2002.

AHIMA, R.S.; FLIOR, J.S. Leptin. **Ann. Rev. Physiol.**, 62:413-435, 2000.

AHIMA, R.S.; OSEI, S.Y. Leptin signaling. **Physiol. Behav.**, 81:223-241, 2004.

AKIYAMA, T.E.; NICOL, C.J.; FIEVET, C.; et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- α regulates lipid homeostasis, but is not associated with obesity: studies with congenic mouse lines. **J. Biol. Chem.**, 276:39088-93, 2001.

ALBERTI, K.G.M.M.; ECKEL, R.H; GRUNDY, S.M.; ZIMMET, P.Z.; CLEEMAN, J.I.; DONATO, K.A.; FRUCHART, J.C.; JAMES, W.P.T.; LORIA, C.M.; SMITH, S.C.JR. Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. **Circulation**, 120:1640-1645, 2009.

ALI, K.; MIDDLETON, M.; PURÉ, E.; RADER, D.J.; Apolipoprotein E Suppresses the Type I Inflammatory Response In Vivo. **Circulation Research**, 97:922-927, 2005.

AL-SHALI, K.Z.; HEGELE, R.A. Laminopathies and Atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 24:1591-1595, 2004.

ARDAILLOU, R. Active fragments of angiotensin II: enzymatic pathways of synthesis and biological effects. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, 6(1):28-34, 1997.

ARNER, P. Free fatty acids- do they play a central role in type 2 diabetes? **Diabetes, Obesity and Metabolism**, 3:11-19, 2001.

ARONIS, A.; MADAR, Z.; TIROSH, O. Mechanism underlying oxidative stress-mediated lipotoxicity: exposure of J774.2 macrophages to triacylglycerols facilitates mitochondrial reactive oxygen species production and cellular necrosis. **Free Radic. Biol. Med.**, 38:1221-1230, 2005.

BARROSO, I.; GURNELL, M.; CROWLEY, V.E.F.; AGOSTINI, M.; SCHWABEK J.W.; et al. Dominant negative mutations in human PPAR γ associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. **Nature**, 402:23-30, 1999.

BARZILAI, N.; WANG, J.; MASSILON, D.; VUGUIN, P.; HAWKINS, M.; ROSSETTI, L. Leptin selectively decreases visceral adiposity and enhances insulin action. **J. Clin. Invest.**, 100:3105-3110, 1997.

BASTA, G.; LAZZERINI, G.; MASSARO, M.; SIMONCINI, T.; TANGANELLI, P.; FU, C.; KISLINGER, T.; STERN, D.M.; SCHMIDT, A.M.; DE CATERINA, R. Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses. **Circulation**, 105:816-822, 2002.

BATALLER, R.; GABELE, E.; PARSONS, C.J.; MORRIS, T.; YANG, L.; SCHOONHOVEN, R.; BRENNER, D.A.; RIPPE, R.A. Systemic infusion of angiotensin II exacerbates liver fibrosis in bile duct-ligated rats. **Hepatology**, 41: 1046-1055, 2005.

BATALLER, R.; GABELE, E.; SCHOONHOVEN, R.; MORRIS, T.; LEHNERT, M.; YANG, L.; BRENNER, D.A.; RIPPE, R.A. Prolonged infusion of angiotensin II into normal rats induces stellate cell activation and proinflammatory events in liver. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, 285:G642–G651, 2003.

BATALLER, R.; GINES, P.; NICOLAS, J.M.; GORBIG, M.N.; GARCIA-RAMALLO, E.; GASULL, X.; BOSCH, J.; ARROYO, V.; RODES, J. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. **Gastroenterology**, 118: 1149-1156, 2000.

BERLINER, J.A.; TERRITO, M.C.; SEVANIAN, A.; RAMIN, S.; KIM, J.A.; BAMSHAD, B.; ESTERSON, M.; FOGELMAN, A.M. Minimally modified LDL stimulates monocyte endothelial interactions. **J Clin Invest.** 85:1260-1266, 1990.

BLASCHKE, F.; LEPPANEN, O.; TAKATA, Y.; et al. Liver X receptor agonists suppress vascular smooth muscle cell proliferation and inhibit neointima formation in balloon-injured rat carotid arteries. **Circ. Res.**, 95:e110–23, 2004.

BLUHER, M. The distinction of metabolically 'healthy' from 'unhealthy' obese individuals. **Current Opinion in Lipidology**, 21(1):38–43 2010.

BODARY, P.F.; GU, S.; SHEN, Y.; HASTY, A.H.; BUCKLER, J.M.; EITZMAN, D.T. Recombinant leptin promotes atherosclerosis and thrombosis in apolipoprotein E–deficient mice. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 25:119-122, 2005.

BORNSTEIN, S.R.; LICINIO, J.; TAUCHNITZ, R.; ENGELMANN, L.; NEGRAO, A.B.; GOLD, P.; et al. Plasma leptin levels are increased in survivors of acute sepsis: associated loss of diurnal rhythm, in cortisol and leptin secretion. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 83:280-3, 1998.

BOSCH, J.; YUSUF, S.; GERSTEIN, H.C.; POGUE, J.; SHERIDAN, P.; DAGENAIS, G.; DIAZ, R.; AVEZUM, A.; LANAS, F.; PROBSTFIELD, J.; FODOR, G.; HOLMAN, R.R. Effect of ramipril on the incidence of diabetes. **N. Engl. J. Med.**, 355:1551–1562, 2006.

BOUCHARD, C.; TREMBLAY, A.; NADEAU, A.; DUSSAULT, J.; DESPRE, J.P.; THERIAULT, G.; LUPIEN, P.J.; et al. Long term exercise training with constant energy intake. 1: Effect on body composition and selected metabolic variables. **Int. J. Obes.**, 14:57-73, 1990.

BRAISSANT, O.; FOUFELLE, F.; SCOTTO, C.; DAUCA, M.; WAHLI W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- α , - β , and - γ in the adult rat. **Endocrinology**, 137:354-366, 1996.

BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. Scavenging for receptors. **Nature**, 343:508-509, 1990.

BYRON, D.; MINUK, G.Y. Clinical hepatology: profile of an urban, hospital-based practice. **Hepatology**, 24:813-815, 1996.

CAO, G.; BEYER, T.P.; YANG, X.P.; SCHMIDT, R.J.; ZHANG, Y.; BENSCH, W.R.; KAUFFMAN, R.F.; GAO, H.; RYAN, T.P.; LIANG, Y.; EACHO, P.I.; JIANG, X.C. Phospholipid transfer protein is regulated by liver X receptors in vivo. **J. Biol. Chem.**, 277:39561-39565, 2002.

CAPRIO, S.; TAMBORLANE, W.V.; SILVER, D. et al. Hiperleptinemia: an early sign of juvenile obesity. Relations to body fat depots and insulin concentration. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, 271:E626-E630, 1996.

CARON-DEBARLE, M.; LAGATHU, C.; BOCCARA, F.; VIGOUROUX, C.; CAPEAU, J. HIV-associated lipodystrophy: from fat injury to premature aging. **Trends. Mol. Med.**, 16(5):218-29, 2010.

CASÓS, K.; SÁIZ, M.P.; RUIZ-SANZ, J.I.; MITJAVILA, M.T. Atherosclerosis prevention by a fish oil-rich diet in apoE^{-/-} mice is associated with a reduction of endothelial adhesion molecules. **Atherosclerosis**, 201:306-317, 2008.

CASTRO, C.H.; SANTOS, R.A.; FERREIRA, A.J.; BADER, M.; ALENINA, N.; ALMEIDA, A.P. Effects of genetic deletion of angiotensin-(1–7) receptor Mas on cardiac function during ischemia/reperfusion in the isolated perfused mouse heart. **Life Sci.**, 80:264-268, 2006.

CAT, A.N.D.; TOUYZ, R.M. A new look at the renin–angiotensin system – Focusing on the vascular system. **Peptides**, 32:2141-2150, 2011.

CHALASANI, N.; DEEQ, M.A.; CRABB, D.W. Systemic levels of lipid peroxidation and its metabolic and dietary correlates in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **Am. J. Gastroenterol.**, 99:1497-502, 2004.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A.; FERRIER, D.R. Lipid metabolism. In: **Biochemistry**, 4^a. edição, 2007.

CHANDRA, R.K. Cell-mediated immunity in genetically obese (C57BL/6/J ob/ob) mice. **Am. J. Clin. Nutri.**, 33:13-20, 1980.

CHIBA, T.; SHINOZAKI, S.; NAKAZAWA, T.; KAWAKAMI, A.; AI, M.; KANEKO, E.; KITAGAWA, M.; et al. Leptin deficiency suppresses progression of atherosclerosis in apoE-deficient mice. **Atherosclerosis**, 196(1):68-75, 2008.

CHILTON, R.J. Pathophysiology of coronary heart disease: a brief review. **JAOA**, supl 7, 104(9):S5-S8, 2004.

CONSIDINE, R.V.; SINHA, M.K.; HEIMAN, M.L.; et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. **N. Engl. J. Med.**, 334:292-5, 1996.

CORTHAY, A. How do regulatory T cells work? **Scand. J. Immunol.**, 70(4):326-36, 2009.

COWLEY, M.A.; SMART, J.L.; RUBINSTEIN, M.; CERDÁN, M.G.; DIANO, S.; HORVATH, T.L.; CONE, R.D.; LOW, M.J. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. **Nature**, 411:480-484, 2001.

CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCOPIO, J. Entendendo a gordura. Os ácidos graxos. 1ª edição. Barueri-SP: **Editora Manole**, 2002. P.123-172.

CURTISS, L.K.; BOISVERT, W.A. Apolipoprotein E and atherosclerosis. **Curr. Opin. Lipidol.**, 11:243-251, 2000.

CUSHING, S.D.; BERLINER, J.A.; VALENTE, A.J.; TERRITO, M.C.; NAVAB, M.; PARHAMI, F.; GERRITY, R.; SCHWARTZ, C.J.; FOGELMAN, A.M. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. **Cell Biology**, 87: 5134-5138, 1990.

DANSKY, H.M.; CHARLTON, S.A.; SIKES, J.L.; HEATH, S.C.; SIMANTOV, R.; LEVIN, L.F.; SHU, P.; et al. Genetic Background Determines the Extent of

Atherosclerosis in ApoE- deficient Mice. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 19:1960-1968, 1999.

DAS, U.N. Is angiotensin-II an endogenous pro-inflammatory molecule? **Med. Sci. Monit.**, 11:RA155-162, 2005.

DAUGHERTY, A.; RATERI, D.L.; LU, H.; INAGAMI, T.; CASSIS, L.A. Hypercholesterolemia stimulates angiotensin peptide synthesis and contributes to atherosclerosis through the AT1A receptor. **Circulation**, 110(25):3849-57, 2004.

DAY, C.P.; JAMES, O.F. Steatohepatitis: a tale of "two hits". **Gastroenterology**, 114:842-5, 1998.

DE GASPARO, M.; CATT, K.J.; INAGAMI, T.; WRIGHT, J.W.; UNGER, T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. **Pharmacol. Rev.**, 52:415-72, 2000.

DELVECCHIO, C.J.; BILAN, P.; RADFORD, K.; et al. Liver X receptor stimulates cholesterol flux and inhibits expression of proinflammatory mediators in human airway smooth muscle cells. **Mol. Endocrinol.**, 21:1324-34, 2007.

DOLLERY, C.; LIBBY, P. Atherosclerosis and proteinase activation. **Cardiovasc. Res.**, 69:625-635, 2006.

DONAHOO, W.T.; JENSEN, D.R.; YOST, T.J.; ECKEL, R.H. Isoproterenol and somatostatin decrease plasma leptin in humans: a novel mechanism regulating leptin secretion. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 82:4139-43, 1997.

DONATI, G.; STAGNI, B.; PISCAGLIA, F.; et al. Increased prevalence of fatty liver in arterial hypertensive patients with normal liver enzymes: role of insulin resistance. **Gut**, 53:1020-3, 2004.

DONG, B.; ZHANG, C.; FENG, J.B.; ZHAO, Y.X.; LI, S.Y.; YANG, Y.P.; DONG, Q.L.; DENG, B.P.; et al. Overexpression of ACE2 Enhances Plaque Stability in a Rabbit Model of Atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 28:1270-1276, 2008.

DONOGHUE, M.; HSIEH, F.; BARONAS, E.; GODBOUT, K.; GOSSELIN, M.; STAGLIANO, N.; et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1–9. **Circ. Res.**, 87:E1–9, 2000.

DUAN, S.Z.; IVASHCHENKO, C.Y.; WHITESALL, S.E.; D'ALECY, L.G.; DUQUAINE, D.C.; BROSIUS, F.C.3RD.; et al. Hypotension, lipodystrophy, and insulin resistance in generalized PPAR gamma-deficient mice rescued from embryonic lethality. **J. Clin. Invest.**, 117:812-822, 2007.

ERICSSON, C.G.; HAMSTEN, A.; NILSSON, J.; GRIP, L.; SVANE, B.; DE FAIRE, U. Angiographic assessment of effects of bezafibrate on progression of coronary artery disease in young male postinfarction patients. **Lancet**, 347:849-853, 1996.

FAROOQI, I.S.; MATARESE, G.; LORD, G.M.; et al. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. **J. Clin. Invest.**, 110:1093-103, 2002.

FERRARIO, C.M. Role of the rennin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. **Am. J. Cardiol.**, 98:121-128, 2006.

FINCK, B.N.; KELLEY, K.W.; DANTZER, R.; JOHNSON, R.W. In vivo and in vitro evidence for the involvement of tumor necrosis factor-alpha in the induction of leptin by lipopolysaccharide. **Endocrinology**, 139:2278-83, 1998.

FIORENZA, C.G.; CHOU, S.H.; MANTZOROS, C.S. Lipodystrophy: Pathophysiology and Advances in Treatment. **Nat. Rev. Endocrinol.**, 7(3):137–150, 2011.

FONTES, MAP; SILVA, LCS; CAMPAGNOLE-SANTOS, MJ; KHOSLA, MC; GUERTZENSTEIN, PG; SANTOS, RAS. Evidence that angiotensin-(1-7) plays a role in the central control of blood pressure at the ventro-lateral medulla acting through specific receptors. **Brain Res.**, 665:175-180, 1994.

FRAYN, K.N. Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. **Diabetologia**, 45:1201-1210, 2002.

FREEMAN, EJ; CHISOLM, GM; FERRARIO, CM; TALLANT, EA. Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth. **Hypertension**, 28(1):104-8, 1996.

GABRIELY, I.; YANG, X.M.; CASES, J.A.; MA, X.H.; ROSSETTI, L.; BARZILAI, N. Hyperglycemia modulates angiotensinogen gene expression. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, 281(3):R795-802, 2001.

GALIS, Z.S.; SUKHOVA, G.K.; LARK, M.W.; LIBBY, P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. **J. Clin. Invest.**, 94:2493-2503, 1994.

GARG, A.; AGARWAL, A.K. Lipodystrophies: Disorders of adipose tissue biology. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*, 1791:507-513, 2009.

GATTONE, M.; LACOVIELLO, L.; COLOMBO, M.; CASTELNUOVO, A.D.; SOFFIANTINO, F.; GRAMONI, A.; PICCO, D.; BENEDETTA, M.; GIANNUZZI, P. Chlamydia pneumoniae and cytomegalovirus seropositivity, inflammatory markers, and the risk of myocardial infarction at a young age. **Am. Heart J.**, 142:633-640, 2001.

GIANI, J.F.; MAYER, M.A.; MUÑOZ, M.C.; SILBERMAN, E.A.; HÖCHT, C.; TAIRA, C.A.; GIRONACCI, M.M.; TURYN, D.; DOMINICI, F.P. 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:E262-E271, 2009.

GIGUÈRE, V. Orphan Nuclear Receptors: from gene to function. **Endocr. Rev.**, 20:689-725, 1999.

GIRENDLING, K.K.; MINIEN, C.A.; OLLERENSHAW, J.D.; ALEXANDER, R.W. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. **Circ. Res.**, 74:1141-48, 1994.

GIRONACCI, M.M.; ADLER-GRASCHINSKY, E.; PEÑA, C.; ENERO, M.A. Effects of angiotensin II and angiotensin-(1-7) on release of [3H]-norepinephrine from rat atria. **Hypertension**, 24:457-60, 1994.

GIRONACCI, M.M.; VATTA, M.; RODRIGUEZ-FERMEPÍN, M.; FERNÁNDEZ, B.E.; PEÑA, C. Angiotensin-(1-7) reduces norepinephrine release through a nitric oxide mechanism in rat hypothalamus. **Hypertension**, 35(6):1248-52, 2000.

GODFREY, G. Observations on obesity. **J. R. Coll. Gen. Pract.**, 21(106):276-81, 1971.

GOLDSCMIDT-CLERMONT, P.J.; CREAGER, M.A.; LOSORDO, D.W.; LAM, G.K.W.; WASSEF, M.; DZAU, V.J. Atherosclerosis 2005: recent discoveries and novel hypotheses. **Circulation**, 112:3348-3353, 2005.

GORDON, I.; GRAUER, E.; GENIS, I.; SEHAYEK, E.; MICHAELSON, D.M. Memory deficits and cholinergic impairments in apolipoprotein E-deficient mice. **Neuroscience letters**, 199:1-4, 1995.

GRAINGER, D.J.; RECKLESS, J.; MCKILLIGIN, E. Apolipoprotein E modulates clearance of apoptotic bodies in vitro and in vivo, resulting in a systemic proinflammatory state in apolipoprotein E-deficient mice. **J. Immunol.**, 173(10):6366-75, 2004.

GRANINGER, M.; REITER, R.; DRUCKER, C.; MINAR, E.; JILMA, B. Angiotensin receptor blockade decreases markers of vascular inflammation. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 44:335-339, 2004.

GREFHORST, A.; ELZINGA, B.M.; VOSHOL, P.J.; PLOSCH, T.; KOK, T.; BLOKS, V.W.; VAN DER SLUIJS, F.H.; et al. Stimulation of lipogenesis by pharmacological activation of the liver X receptor leads to production of large, triglyceride-rich very low density lipoprotein particles. **Journal of Biological Chemistry**, 277:34182-34190, 2002.

GROTHUSEN, C.; BLEY, S.; SELLE, T.; LUCHTEFELD, M.; GROTE, K.; TIETGE, U.J.F.; DREXLER, H.; SCHIEFFER, B. Combined effects of HMG-CoA-reductase inhibition and renin-angiotensin system blockade on experimental atherosclerosis. **Atherosclerosis**, 182:57-69, 2005.

HANLEY, M.R.; CHEUNG, W.T.; HAWKINS, P.; POYNER, D.; BENTON, H.P.; BLAIR, L.; JACKSON, T.R.; GOEDERT, M. The mas oncogene as a neural peptide receptor: expression, regulation and mechanism of action. **Ciba Found. Symp.**, 150:23-38, 1990.

HANSSON, G.K.; LIBBY, P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. **Nat. Rev. Immunol.**, 6: 508-519, 2006.

HAQUE, W.A.; SHIMOMURA, I.; MATSUZAWA, Y.; GARG, A. Serum adiponectin and leptin levels in patients with lipodystrophies. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 87(5):2395, 2002.

HASHIMOTO, T.; COOK, W.S.; QI, C.; YELDANDI, A.V.; REDDY, J.K.; RAO, M.S. Defect in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting. **J. Biol. Chem.**, 275: 28918-28928, 2000.

HAUSER, P. S.; NARAYANASWAMI, V.; RYAN, R.O. Apolipoprotein E: from lipid transport to neurobiology. **Prog. Lipid. Res.**, 50(1):62-74, 2011.

HAYEK, T.; ATTIAS, J.; COLEMAN, R.; BRODSKY, S.; SMITH, J.; BRESLOW, J.L.; KEIDAR, S. The angiotensin-converting enzyme inhibitor, fosinopril, and the angiotensin II receptor antagonist, losartan, inhibit LDL oxidation and attenuate atherosclerosis independent of lowering blood pressure in apolipoprotein E deficient mice. **Cardiovasc. Res.**, 44(3):579-87, 1999.

HERATH, C.B.; WARNER, F.J.; LUBEL, J.S.; DEAN, R.G.; JIA, Z.; LEW, R.A.; SMITH, A.I.; BURRELL, L.M.; ANGUS, P.W. Upregulation of hepatic angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and angiotensin-(1-7) levels in experimental biliary fibrosis. **Journal of Hepatology**, 47:387-395, 2007.

HERZ, J.; BEFFERT, U. Apolipoprotein E receptors: linking brain development and Alzheimer's disease. **Nat. Rev. Neurosci.** 1:51, 2000.

HILDEN, M.; CHRISTOFFERSEN, P.; JUHL, E.; DALGAARD, J.B. Liver histology in a 'normal' population: examination of 503 consecutive fatal traffic casualties. **Scand. J. Gastroenterol.**, 12:593-597, 1977.

HOFMANN, S.M.; PEREZ-TILVE, D.; GREER, T.M.; COBURN, B.A.; GRANT, E.; BASFORD, J.E.; TSCHOP, M.H.; HUI, D.Y. Defective lipid delivery modulates glucose tolerance and metabolic response to diet in apolipoprotein E-deficient mice, **Diabetes**, 57:5-12, 2008.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**, 299:1057-1061, 2003.

HUANG, M.L.; LI, X.; MENG, Y.; XIAO, B.; MA, Q.; YING, S.; WU, P.; ZHANG, Z. Upregulation of angiotensin-converting enzyme (ACE) 2 in hepatic fibrosis by ACE inhibitors. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 37:e1-e6, 2010.

HUANG, Y.; LIU, X.Q.; RALL JR., S.C.; TAYLOR, J.M.; VON ECKARDSTEIN, A.; ASSMANN, G.; MAHLEY, R.W. Overexpression and accumulation of apolipoprotein E as a cause of hypertriglyceridemia. **J. Biol. Chem.**, 273:26388-26393, 1998.

IHKUNI, N.; LAM, Q.L.K.; LU, L.; MATARESE, G.; LA CAVA, A. Leptin and Inflammation. **Curr. Immunol. Rev.**, 4(2): 70-79, 2008.

IP, E.; FARRELL, G.; HALL, P.; ROBERTSON, G.; LECLERCQ, I. Administration of the Potent PPAR α Agonist, Wy-14,643, Reverses Nutritional Fibrosis and Steatohepatitis in Mice. **Hepatology**, 39:1286-1296, 2004.

IP, E.; FARRELL, G.C.; ROBERTSON, G.; HALL, P.; KIRSCH, R.; LECLERCQ, I. Central Role of PPAR α -Dependent Hepatic Lipid Turnover in Dietary Steatohepatitis in Mice. **Hepatology**, 38(1):123-32, 2003.

ISHIMOTO, K.; TACHIBANA, K.; SUMITOMO, M.; OMOTE, S.; HANANO, I.; YAMASAKI, D.; WATANABE, Y.; et al. Identification of human low-density lipoprotein receptor as a novel target gene regulated by liver X receptor alpha. **FEBS Lett**, 580: 4929-4933, 2006.

JAVOR, E.D.; GHANY, M.G.; COCHRAN, E.K.; et al. Leptin reverses nonalcoholic steatohepatitis in patients with severe lipodystrophy. **Hepatology**, 41:753-760, 2005.

JAWIEN, J.; NASTALEK, P.; KORBUT, R. Mouse models of experimental atherosclerosis. **Journal of Physiology and Pharmacology**, 55(3):503-517, 2004.

JEQUIER, E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 967:379-388, 2002.

JOHNSON, P.R.; GREENWOOD, M.R.C. The adipose tissue. In: "Cell and tissue biology: a textbook of histology." Ed by L. Weiss, 6th edition, **Urban and Shwarzenberg**, Baltimore, p. 191-209, 1988.

JONASSON, L.; HOLM, J.; SKALLI, O.; BONDJERS, G.; HANSSON, G. K. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. **Arteriosclerosis**, 6:131-138, 1986.

JONSSON, J.R.; CLOUSTON, A.D.; ANDO, Y.; KELEMEN, L.I.; HORN, M.J.; ADAMSON, M.D.; PURDIE, D.M.; POWELL, E.E. Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the progression of rat hepatic fibrosis. **Gastroenterology**, 121:148-55, 2001.

JOSEPH, S.B.; CASTRILLO, A.; LAFFITTE, B.A.; MANGELSDORF, D.J.; TONTONOZ, P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. **Nat. Med.**, 9:213-219, 2003.

JOSEPH, S.B.; LAFFITTE, B.A.; PATEL, P.H.; WATSON, M.A.; MATSUKUMA, K.E.; WALCZAK, R.; COLLINS, J.L.; OSBORNE, T.F.; TONTONOZ, P. Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. **J. Biol. Chem.**, 277:11019-11025, 2002.

JOSEPH, S.B.; MCKILLIGIN, E.; PEI, L.; WATSON, M.A.; COLLINS, A.R.; LAFFITTE, B.A.; CHEN, M.; NOH, G.; et al. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 99:7604-7609, 2002 a.

JUURINEN, L.; TIIKKAINEN, M.; HAKKINEN, A.M.; et al. Effects of insulin therapy on liver fat content and hepatic insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, 292(3):E829-35, 2007.

KÁDÁR, A.; GLASZ, T. Development of atherosclerosis and plaque biology. **Cardiovascular Surgery**, 9(2):109-121, 2001.

KAHN, K.; BUSE, J.; FERRANNINI, E.; STERN, M. The Metabolic Syndrome: Time for a Critical Appraisal. Joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. **Diabetes Care**, 28:2289-2304, 2005.

KAMPF, C.; LAU, T.; OLSSON, R.; LEUNG, P.S.; CARLSSON, P.O. Angiotensin II type 1 receptor inhibition markedly improves the blood perfusion, oxygen tension and first phase of glucose-stimulated insulin secretion in revascularised syngeneic mouse islet grafts. **Diabetologia**, 48(6):1159-67, 2005.

KARAVIA, E.A.; PAPACHRISTOU, D.J.; KOTSIKOIANNI, I.; GIOPANOU, I.; KYPREOS, K.E. Deficiency in apolipoprotein E has a protective effect on diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice. **FEBS Journal**, 278:3119-3129, 2011.

KEIDAR, S.; KAPLAN, M.; AVIRAM, M. Angiotensin II-modified LDL is taken up by macrophages via the scavenger receptor, leading to cellular cholesterol accumulation. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 16(1):97-105, 1996.

KEIDAR, S.; KAPLAN, M.; GAMLIEL-LAZAROVICH, A. ACE2 of the heart: from angiotensin I to angiotensin (1-7). **Cardiovascular Research**, 73:463-469, 2007.

KERSHAW, E.E.; FLIER, J.S. Adipose tissue as a endocrine organ. **The journal of endocrinology & metabolism**, 8(6):2548-2556, 2004.

KERSTEN, S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. **EMBO Reports**, 21(41): 282-286, 2001.

KIM, J.A.; BERLINER, J.A.; NADLER, J.L. Angiotensin II increases monocyte binding to endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 226:862-868, 1996.

KIM, J.K.; FILLMORE, J.J.; CHEN, Y.; YU, C.; MOORE, I.K.; PYPART, M.; LUTZ, E.P.; et al. Tissue specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 98:7522-7, 2001.

KIM, K.H.; LEE, K.; MOON, Y.S.; SUL, H.S. A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. **J. Biol. Chem.**, 276:11252-11256, 2001.

KINTSCHER, U.; BRAMLAGE, P.; PAAR, W.D.; THOENES, M.; UNGER, T. Irbesartan for the treatment of hypertension in patients with the metabolic syndrome: a sub analysis of the Treat to Target post authorization survey. Prospective observational, two armed study in 14,200 patients. **Cardiovasc. Diabetol.**, 3:6-12, 2007.

KUCHAREWICZ, I; CHABIELSKA, E; PAWLAK, R; MATYS, T; ROLKOWSKI, R; BUCZKO, W. The antithrombotic effect of angiotensin-(1-7) closely resembles that of losartan. **J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.**, 1(3):268-272, 2000.

KUDO, H.; YATA, Y.; TAKAHARA, T.; KAWAI, K.; NAKAYAMA, Y.; KANAYAMA, M.; OYA, T.; et al. Telmisartan attenuates progression of steatohepatitis in mice: role of hepatic macrophage infiltration and effects on adipose tissue. **Liver Int.**, 29(7):988-96, 2009.

KWITEROVICH, Jr.P.O. The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides: a current review. **Am. J. Cardiol.**, 86 (suppl):5L-10L, 2000.

LAFFITTE, B.A.; REPA, J.J.; JOSEPH, S.B.; WILPITZ, D.C.; KAST, H.R.; MANGELSDORF, D.J.; TONTONOZ, P. LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 98: 507-512, 2001.

LAFONTAN, M.; BERLAN, M. Fat cell adrenergic receptor and the control of white and brown fat cell function. **J. Lipid. Res.**, 34:1057, 1993.

LAMB, R.; KOCH, J.; BUSH, S. An enzymatic explanation of the differential effects of oleate and gemfibrozil on cultured hepatocyte triacylglycerol and phosphatidylcholine biosynthesis and secretion. **Biochim. Biophys. Acta**, 1165:299-305, 1993.

LE TRAN, Y.; FORSTER, C. Angiotensin-(1-7) and the rat aorta: modulation by the endothelium. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 30:676-82, 1997.

LEBLANC, A.C.; PODUSLO, J.F. Regulation of apolipoprotein E gene expression after injury of the rat sciatic nerve. **J. Neurosci. Res.**, 25:162-71, 1990.

LEE, Y.; WANG, M.Y.; KAKUMA, T.; et al. Liporegulation in diet-induced obesity: The antisteatotic role of hyperleptinemia. **J. Biol. Chem.**, 276:5629-35, 2001.

LEE, Y.; YU, X.; GONZALES, F.; MANGELSDORF, D.J.; WANG, M.; RICHARDSON, C.; WITTERS, L.A.; UNGER, R.H. PPAR α is necessary for the lipopenic action of hyperleptinemia on white adipose and liver tissue. **PNAS**, 99(18): 11848-11853, 2002.

LEHRKE, M.; REILLY, M.P.; MILLINGTON, S.C.; IQBAL, N.; RADER, D.J.; LAZAR, M.A. An inflammatory cascade leading to hyperresistinemia in humans. **PLoS. Med.**, 1:e45, 2004.

LI, H.; MATHENY, M.; SCARPACE, P.J. Beta 3-Adrenergic-mediated suppression of leptin gene expression in rats. **Am. J. Physiol.**, 272:E1031-6, 1997.

LICHTENSTEIN, A.H. Atherosclerosis. In: Present Knowled in Nutrition. 7th edition. **ILIS Press**. Washington DC. 42:430-437, 1996.

LIU, C.; LV, X.H.; LI, H.X.; CAO, X.; ZHANG, F.; WANG, L.; YU, M.; YANG, J.K. Angiotensin-(1-7) suppresses oxidative stress and improves glucose uptake via Mas receptor in adipocytes. **Acta Diabetol.**, 49(4):291-9, 2012.

LORD, G.M.; MATARESE, G.; HOWARD, J.K.; BAKER, R.J.; BLOOM, S.R.; LECHLER, R.I. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. **Nature**, 394:897-901, 1998.

LOVREN, F.; PAN, Y.; QUAN, A.; TEOH, H.; WANG, G.; SHUKLA, P.C.; LEVITT, K.S.; OUDIT, G.Y.; et al. Angiotensin converting enzyme-2 confers endothelial protection and attenuates atherosclerosis. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, 295:H1377-H1384, 2008.

Lu, S.C.; Shieh, W.Y.; Chen, C.Y.; Hsu, S.C.; Chen, H.L. Lipopolysaccharide increases resistin gene expression in vivo and in vitro. **FEBS Lett.**, 530: 158-162, 2002.

LUBEL, J.S.; HERATH, C.B.; TCHONGUE, J.; GRACE, J.; JIA, Z.; SPENCER, K.; CASLEY, D.; CROWLEY, P.; SIEVERT, W.; BURRELL, L.M.; ANGUS, P.W. Angiotensin-(1-7), an alternative metabolite of the renin-angiotensin system, is up-regulated in human liver disease and has antifibrotic activity in the bile-duct-ligated rat. **Clinical Science**, 117:375-386, 2009.

MAHLEY, R.W.; RALL Jr, S.C. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, 1:507-37, 2000.

MALLIKA, V.; GOSWAMI, B.; RAJAPPA, M. Atherosclerosis pathophysiology and the role of novel risk factors: a clinicobiochemical perspective. **Angiology**, 58(5):513-522, 2007.

MALMENDIER, C.; DELCROIX, C. Effects of fenofibrate on high and low density lipoprotein metabolism in heterozygous familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, 55:161-169, 1985.

MANNING-TOBIN, J.J.; MOORE, K.J.; SEIMON, T.A.; BELL, S.A.; SHARUK, ALVAREZ-LEITE, J.I.; WINTHER, M.P.J. de; TABAS, I. FREEMAN, M.W. Loss of SR-A and CD 36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 29:19-26, 2009.

MARIO, E.G.; SANTOS, S.H.S.; FERREIRA, A.V.M.; BADER, M.; SANTOS, R.A.S.; BOTION, L.M. Angiotensin-(1–7) Mas-receptor deficiency decreases peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in adipocytes. **Peptides**, 33:174-177, 2012.

MARQUES, F.D.; FERREIRA, A.J.; SINISTERRA, R.D.; JACOBY, B.A.; SOUSA, F.B.; CALIARI, M.V.; SILVA, G.A.; MELO, M.B.; NADU, A.P.; SOUZA, L.E.; et al. An oral formulation of angiotensin-(1-7) produces cardioprotective effects in infarcted and isoproterenol-treated rats. **Hypertension**, 57:477-483, 2011.

MARQUES, F.D.; MELO, M.B.; SOUZA, L.E.; IRIGOYEN, M.C.; SINISTERRA, R.D.; DE SOUSA, F.B.; SAVERGNINI, S.Q.; BRAGA, V.B.; FERREIRA, A.J.; SANTOS, R.A. Beneficial effects of long-term administration of an oral formulation of Angiotensin-(1-7) in infarcted rats. **Int. J. Hypertens.**, 2012:795452, 2012.

MARX, N.; DUEZ, H.; FRUCHART, J.; STAELS, B. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Atherogenesis. **Circ. Res.**, 94:1168-1178, 2004.

MARX, N.; SUKHOVA, G.K.; COLLINS, T.; LIBBY, P.; PLUTZKY, J. PPAR- α activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. **Circulation**, 99(24):3125-3131, 1999.

MCAVOY, N.C.; FERGUSON, J.W.; CAMPBELL, I.W. HAYES, P.C. Non-alcoholic fatty liver disease: natural history, pathogenesis and treatment. **Br. J. Diabetes Vasc. Dis.**, 6:251–60, 2006.

MEDINA, J.; FERNANDEZ-SALAZAR, L.I.; GARCIA-BUEY, L.; MORENO-OTERO, R. Approach to the pathogenesis and treatment of nonalcoholic steatohepatitis. **Diabetes Care**, 27:2057-2066, 2004.

MEIR, K.S.; LEITERSDORF, E. Atherosclerosis in the Apolipoprotein E–Deficient Mouse: A Decade of Progress. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 24:1006-1014, 2004.

MICHAEL, D.R.; ASHLIN, T.G.; BUCKLEY, M.L.; RAMJI, D.P. Liver X Receptors, Atherosclerosis and Inflammation. **Curr. Atheroscler. Rep.**, 14:284-293, 2012.

MINOKOSHI, Y.; KIM, Y.B.; PERONI, O.D.; et al. Leptin stimulates fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nature**, 415:339-43, 2002.

MIYAZAKI, M.; SAKONJO, H.; TAKAI, S. Anti-atherosclerotic effects of angiotensin converting enzyme inhibitor and angiotensin II antagonist in *Cynomolgus* monkeys fed a high-cholesterol diet. **British Journal of Pharmacology**, 128:523-529, 1999.

MONTECUCCO, F.; VUILLEUMIER, N.; PAGANO, S.; LENGLET, S.; BERTOLOTTI, M.; BRAUNERSREUTHER, V.; PELLI, G.; et al. Anti-Apolipoprotein A-1 auto-antibodies are active mediators of atherosclerotic plaque vulnerability. **Eur. Heart J.**, 32:412-421, 2011.

MUÑOZ, M.C.; GIANI, J.F.; BURGHI, V.; MAYER, M.A.; CARRANZA, A.; TAIRA, C.A.; DOMINICI, F.P. The Mas receptor mediates modulation of insulin signaling by angiotensin-(1-7). **Regul. Pept.**, 177(1-3):1-11, 2012.

NABESHIMA, Y.; TAZUMA, S.; KANNO, K.; HYOGO, H.; CHAYAMA, K. Deletion of angiotensin II type I receptor reduces hepatic steatosis. **Journal of Hepatology**, 50:1226-1235, 2009.

NAIK, S.U.; WANG, X.; DA SILVA, J.S.; JAYE, M.; MACPHEE, C.H.; REILLY, M.P.; BILLHEIMER, J.T.; ROTHBLAT, G.H.; RADER, D.J. Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo. **Circulation**, 113:90-97, 2006.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger Princípios de Bioquímica. 4ª ed. **Sarvier**. São Paulo, SP. pp 807-819, 2006.

NEUSCHWANDER-TETRI, B.A.; CALDWELL, S.H. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD single topic conference. **Hepatology**, 37(5):1202-19, 2003.

NGUYEN, P.; LERAY, V.; DIEZ, M.; SERISIER, S.; LE BLOC'H, J.; SILIART, B.; DUMON, H. Liver lipid metabolism. **J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.**, 92(3):272-83, 2008.

NICKENIG, G.; JUNG, O.; STREHLOW, K.; ZOLK, O.; LINZ, W.; SCHÖLKENS, B.A.; BÖHM, M. Hypercholesterolemia is associated with enhanced angiotensin AT1-receptor expression. **Am. J. Physiol.**, 272(6 Pt 2):H2701-7, 1997.

NILSSON, N.O.; STRÅLFORS, P.; FREDRIKSON, G.; BELFRAGE, P. Regulation of adipose tissue lipolysis: effects of noradrenaline and insulin on phosphorylation of hormone-sensitive lipase and on lipolysis in intact rat adipocytes. **FEBS Lett.**, 111(1):125-30,1980.

NIVELSTEIN-POST, P.F.E.M.; FOGELMAN, A.M.; MOTTINO, G.; FRANK, J.S. Lipid accumulation in rabbit aortic intima 2 hours after bolus infusion of low density lipoprotein. A deep-etch and immunolocalization study of rapidly frozen tissue. **Arterioscler. Tromb.** 11:1795-1805, 1991.

OCARANZA, M.P.; LAVANDERO, S.; JALIL, J.E.; MOYA, J.; PINTO, M.; NOVOA, U.; APABLAZA, F.; GONZALEZ, L.; HERNANDEZ, C.; VARAS, M.; LOPEZ, R.; GODOY, I.; VERDEJO, H.; CHIONG, M. Angiotensin-(1-9) regulates cardiac hypertrophy in vivo and in vitro. **J. Hypertens.**, 28(5):1054-64, 2010.

OGAWA, D.; STONE, J.F.; TAKATA, Y.; et al. Liver x receptor agonists inhibit cytokine-induced osteopontin expression in macrophages through interference with activator protein-1 signaling pathways. **Circ. Res.**, 96:e59-67, 2005.

ORAL, E.A.; VINAYASIMHA, M.D.; ELAINERUIZ, N.P.; ALEXAANDEWELT, B.S.; AHALYAPREMKUMAR, M.D. et al. Efficacy and safety of leptin replacement in lipody-strophy. **N. Engl. J. Med.**, 346:570-578, 2002.

OSTERREICHER, C.; TAURA, K.; MINICIS, S.; SEKI, E.; PENZ-OSTERREICHER, M.; et al. Angiotensin-Converting-Enzyme 2 Inhibits Liver Fibrosis in Mice. **Hepatology**, 50(3):929-938, 2009.

PAIZIS, G.; COOPER, M.E.; SCHEMBRI, J.M.; TIKELLIS, C.; BURRELL, L.M.; ANGUS, P.W. Up-regulation of components of the renin-angiotensin system in the bile duct-ligated rat liver. **Gastroenterology**, 123:1667-1676, 2002.

PARDRIDGE, W.M. Receptor-mediated peptide transport through the blood–brain barrier. **Endocr. Rev.**, 7:314-30, 1986.

PARHAMI, E.; FANG, Z.T.; FOGELMAN, A.M.; ANDALIBI, A.; TERRITO, M.C.; BERLINER, J.A. Minimally modified low density lipoprotein-induced inflammatory responses in endothelial cells are mediated by cyclic adenosine monophosphate. **J. Clin. Invest.**, 92:471-478, 1993.

PARTHASARATHY, S.; RAGHAVAMENON, A.; GARELNABI, M.O.; SANTANAM, N. Oxidized Low-Density Lipoprotein. **Methods Mol. Biol.**, 610:403-17, 2010.

PATEL, L.; BUCKELS, A.C.; KINGHORN, I.J.; MURDOCK, P.R.; HOLBROOK, J.D.; PLUMPTON, C.; MACPHEE, C.H.; SMITH, S.A. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 300:472-476, 2003.

PATSCH, J.R.; MIESENBOCK, G.; HOPFERWIESER, T.; MUHLBERGER, V.; KUAPP, E.; DUNN, J.K.; GOTTO, A.M.JR. PATSCH, W. Relation of triglyceride metabolism and coronary artery disease. **Arterioscler. Thromb.**, 12:1336-1345, 1992.

PENG, D.; HIIPAKKA, R.A.; REARDON, C.A.; GETZ, G.S.; LIAO, S. Differential anti-atherosclerotic effects in the innominate artery and aortic sinus by the liver X receptor agonist T0901317. **Atherosclerosis**, 203:59-66, 2009.

PEREIRA, R.M.; SANTOS, R.A.S.; TEIXEIRA, M.M.; LEITE, V.H.R.; COSTA, L.P.; DIAS, F.L.C.; BARCELOS, L.S.; COLLARES, G.B.; SILVA, A.C.S. The renin–angiotensin system in a rat model of hepatic fibrosis: Evidence for a protective role of Angiotensin-(1–7). **Journal of Hepatology**, 46:674-681, 2007.

PETERSEN, K. F.; ORAL, E. A.; DUFOUR, S.; BEFROY, D.; ARIYAN, C.; YU, C.; CLINE, G.W.; DEPAOLI, A.M.; TAYLOR, S.I.; GORDEN, P.; SHULMAN, G.I. Leptin reverses insulin resistance and hepatic steatosis in patients with severe lipodystrophy. **J. Clin. Invest.**, 109:1345-1350, 2002.

PETTINELLI, P.; ARAYA, J.; DEL POZO, T.; AYARA, J.; RODRIGO, R.; ARAYA, A.V.; SMOK, G.; et al. Enhancement in liver SREBP-1c/PPAR- α ratio and steatosis in obese patients: correlations with insulin resistance and n-3 polyunsaturated fatty acid depletion. **Biochim. Biophys. Acta. Mol. Bases Dis.**, 1792:1080-1086, 2009.

PIEDRAHITA, J.A.; ZHANG, S.H.; HAGAMAN, J.R.; OLIVER, P.M.; MAEDA, N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. **PNAS**, 89:4471-4475, 1992.

PLUMP, A.S.; BRESLOW, J.L. Apolipoprotein E and the apolipoprotein E-deficient mouse. **Annu. Rev. Nutr.**, 15:495-518, 1995.

PLUMP, A.S.; SMITH, J.D.; HAYEK, T.; AALTO-SETELA, K.; et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E - deficient mice created by homologous recombination in ES cells. **Cell**, 71:343-353, 1992.

PRINS, J.B. Adipose tissue as an endocrine organ. **Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.** 16(4):639-651, 2002.

PUTNAM, K.; SHOEMAKER, R.; YIANNIKOURIS, F.; CASSIS, L.A. The renin-angiotensin system: a target of and contributor to dyslipidemias, altered glucose homeostasis, and hypertension of the metabolic syndrome. **Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.** 302:H1219-H1230, 2012.

QUINN, M.T.; PARTHASARATHY, S.; FONG, L.G.; STEINBERG, D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 84:2995-2998, 1987.

RADER, D.J.; DAUGHERTY, A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. **Nature**, 451:904-913, 2008.

RAJAGOPALAN, S.; MENG, X.P.; RAMASAMY, S.; HARRISON, D.G.; GALIS, Z.S. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro: implications of atherosclerotic plaque stability. **J. Clin. Invest.**, 98:2572-2579, 1996.

RAJALA, M.W.; OBICI, S.; SCHERER, P.E.; ROSSETTI, L. Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production, **J. Clin. Invest.** 111:225-230, 2003.

RAJAVASISTH, T.B.; ANDALIBI, A.; TERRITO, M.C.; BERLINER, J.A.; NAVAB, M.; FOGELMAN, A.M.; LUSIS, A.J. Modified LDL induce endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony stimulation factors. **Nature**, 344:254-257, 1990.

RASHID, S.; WATANABE, T.; SAKAUE, T.; et al. Mechanisms of HDL lowering in insulin resistant, hypertriglyceridemic states: the combined effect of HDL triglyceride enrichment and elevated hepatic lipase activity. **Clin. Biochem.**, 36(6):421-9, 2003.

RASMUSSEN, D.D.; BOLDT, B.M.; WILKINSON, C.W.; YELLON, S.M.; MATSUMOTO, A.M. Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. **Endocrinology**, 140:1009-12, 1999.

REPA, J.J.; MANGELSDORF, D.J. The liver X receptor gene team: potential new players in atherosclerosis. **Nat. Med.**, 8(11):1243-8, 2002.

RICE, G.I.; THOMAS, D.A.; GRANT, P.J.; TURNER, A.J.; HOOPER, N.M. Evaluation of angiotensin converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. **Biochem. J.**, 383:45-51, 2004.

RICHEY, J.M.; ADER, M.; MOORE, D.; BERGMAN, R.N. Angiotensin II induces insulin resistance independent of changes in interstitial insulin. **Am. J. Physiol.**, 277(5 Pt 1):E920-6, 1999.

ROBINSON-RECHAVI, M.; CARPENTIER A, S.; DUFFRAISSE, M.; LAUDET, V. How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? **Trends Genet.**, 17:554-556, 2001.

ROSENSON, R.S. Statins in atherosclerosis: lipid-lowering agents with antioxidant capabilities. **Atherosclerosis**, 173:1-12, 2004.

ROSS R. The pathogenesis of atherosclerosis - an update. **N. Engl. J. Med.**, 314:400-500, 1986.

ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. **Nature**, 362:801-809, 1993.

SAAD, M.F.; DAMANI, S.; GINGERICH, R.L.; RIAD-GABRIEL, M.G.; KHAN, A.; BOYADJIAN, R.; et al. Sexual dimorphism in plasma leptin concentration. **J Clin Endocrinol. Metab.**, 82:579-84, 1997.

SAMPAIO, W.O.; NASCIMENTO, A.A.; SANTOS, R.A.S. Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1-7) in rats. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, 284:H1985-94, 2003.

SANCHEZ-MARGALET, V.; MARTIN-ROMERO, C.; SANTOS-ALVAREZ, J.; GOBERNA, R.; NAJIB, S.; GONZALEZ-YANES, C. Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action. **Clin. Exp. Immunol.**, 133:11-9, 2003.

SANTOS, R.A.S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J. Central and peripheral actions of angiotensin-(1-7). **Braz. J. Med. Biol. Res.** 27:1033-47, 1994.

SANTOS, R.A.S.; CASTRO, C.H.; GAVA, E.; PINHEIRO, S.V.B.; ALMEIDA, A.P.; PAULA, R.D.; et al. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor Mas knockout mice. **Hypertension**, 47:996-1002, 2006.

SANTOS, R.A.S.; FERREIRA, A.J.; VERANO-BRAGA, T.; BADER, M. Angiotensin-converting enzyme 2, Angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the Renin Angiotensin System. **J. Endocrinol.**, 216(2):R1-R17, 2013.

SANTOS, R.A.S.; SIMÕES E SILVA, A.C.; MARIC, C.; SILVA, D.M.; MACHADO, R.P.; DE BUHR, I; et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 100:8258-63, 2003.

SANTOS, S.H.; BRAGA, J.F.; MARIO, E.G.; PÔRTO, L.C.; RODRIGUES-MACHADO, M.G.; MURARI, A.; BOTION, L.M.; ALENINA, N.; BADER, M.; SANTOS, R.A. Improved lipid and glucose metabolism in transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1-7). **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 30(5):953-61, 2010.

SANTOS, S.H.; FERNANDES, L.R.; MARIO, E.G.; FERREIRA, A.V.; PÔRTO, L.C.; ALVAREZ-LEITE, J.I.; BOTION, L.M.; BADER, M.; ALENINA, N.; SANTOS, R.A. Mas Deficiency in FVB/N Mice Produces Marked Changes in Lipid and Glycemic Metabolism. **Diabetes**, 57(2):340-7, 2008.

SASAKI, N.; YAMASHITA, T.; TAKEDA, M.; HIRATA, K. Regulatory T cells in atherogenesis. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, 19(6):503-515, 2012.

SATO, N.; KOBAYASHI, K.; INOBUCHI, T.; et al. Adenovirus-mediated high expression resistin causes dyslipidemia in mice. **Endocrinol.**, 146: 273-279, 2005.

SAVAGE, D.B. Mouse models of inherited lipodystrophy. **Disease Models & Mechanisms**, 2:554-562, 2009.

SAVAGE, D.B.; SEWTER, C.P.; KLENK, E.S.; SEGAL, D.G.; VIDAL-PUIG, A.; et al. Resistin/Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. **Diabetes**, 50:2199-2202, 2001.

SAVERGNINI, S.Q.; BEIMAN, M.; LAUTNER, R.Q.; DE PAULA-CARVALHO, V.; ALLAHADADI, K.; PESSOA, D.C.; COSTA-FRAGA, F.P.; et al. Vascular relaxation, antihypertensive effect, and cardioprotection of a novel peptide agonist of the MAS receptor. **Hypertension**, 56:112-120, 2010.

SCHIAVONE, M.T.; SANTOS, R.A.S.; BROSNIHAN, K.B.; KHOSLA, M.C.; FERRARIO, C.M. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 85:4095-8, 1988.

SCHMITZ, G.; ASLANIDIS, C.; LACKNER, K.J. Recent advances in molecular genetics of cardiovascular disorders. Implications for atherosclerosis and diseases of cellular lipid metabolism. **Pathology Oncology Research**, 4(2):152-160, 1998.

SCHULTZ, J.R.; TU, H.; LUK, A.; REPA, J.J.; MEDINA, J.C.; LI, L. SCHWENDNER, S.; WANG, S.; THOOLEN, M.; MANGELSDORF, D.J.; et al. Role of LXRs in control of lipogenesis. **Genes and Development**, 14:2831-2838, 2000.

SEPPALA-LINDROOS, A.; VEHKAVAARA, S.; HAKKINEN, A.M.; et al. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 87(7):3023-8, 2002.

SEUFERT, J. Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function. **Diabetes**, 53(Suppl 1):S152-S158, 2004.

SHEN, J.; SAKAIDA, I.; UCHIDA, K.; TERAJ, S.; OKITA, K. Leptin enhances TNF- α production via p38 and JNK MAPK in LPS-stimulated Kupffer cells. **Life Sci.**, 77:1502-15, 2005.

SHIMOMURA, I.; HAMMER, R.E.; RICHARDSON, J.A.; IKEMOTO, S.; BASHMAKOV, Y.; GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S. Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. **Genes Dev.**, 12(20):3182-94, 1998.

SIASOS, G.; TOUSOULIS, S.K.; OIKONOMOU, E. et al. Inflammatory mechanisms in atherosclerosis: the impact of matrix metalloproteinases. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 12:1132-1148, 2012.

SIRAGY, H.M.; HUANG, J. Renal (pro)renin receptor upregulation in diabetic rats through enhanced angiotensin AT1 receptor and NADPH oxidase activity. **Exp. Physiol.**, 93(5):709-14, 2008.

SLONIGER, J.A.; SAENGSIKISUWAN, V.; DIEHL, C.J.; DOKKEN, B.B.; LAILERD, N.; LEMIEUX, A.M.; KIM, J.S.; HENRIKSEN, E.J. Defective insulin signaling in skeletal muscle of the hypertensive TG(mREN2)27 rat. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, 288(6):E1074-81, 2005.

SONG, C.; HIIPAKKA, R.A.; KOKONTIS, J.M.; LIAO, S. Ubiquitous receptor: structures, immuno-cytochemical localization, modulation of gene activation by receptors for retinoic acids and thyroid hormones. **Ann. NY Acad. Sci.**, 761: 38-49, 1995.

SONODA, J.; PEI, L.; EVANS, R.M. Nuclear receptors: decoding metabolic disease. **FEBS Lett.** 58(1):2-9, 2008.

SPALDING, K.L.; ARNER, E.; WESTERMARK, P.O.; BERNARD, S.; BUCHHOLZ, B.A.; BERGMANN, O.; BLOMQVIST, L.; HOFFSTEDT, J.; NASLUND, E.; BRITTON, T.; et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. **Nature**, 453 783-787, 2008.

SPARROW, C.P.; PARTHASARATY, S.; STEINBERG, D. A macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein. **J. Biol. Chem.**, 264:2599-2604, 1989.

STAEELS, B.; DALLONGEVILLE, J.; AUWERX, J.; SCHOONJANS, K.; LEITERSDORF, E.; FRUCHART, J.C. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. **Circulation**, 98(19):2088-2093, 1998.

STARY, H.C.; CHANDLER, A.B.; GLAGOV, S.; GUYTON, J.R.; INSULL, W.Jr.; et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on atherosclerosis, American Heart Association. **Circulation**, 89:2462-2478, 1994.

STEPHAN, C.M.; BALLEY, S.T.; BHAT, S.; BROWN, E.J.; BANERJEE RR, WRIGHT C, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. **Nature**, 409:307-12, 2001.

STIENSTRA, R.; MANDARD, S.; PATSOURIS, D.; MAASS, C.; KERSTEN, S.; MÜLLER, M. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha protects against obesity-induced hepatic inflammation. **Endocrinology**, 148:2753-63, 2007.

STRAWN, W.B.; CHAPPELL, M.C.; DEAN, R.H.; KIVLIGN, S.; FERRARIO, C.M. Inhibition of early atherogenesis by losartan in monkeys with diet-induced hypercholesterolemia. **Circulation**, 101:1586-1593, 2000.

STRAWN, W.B.; GALLAGHER, P.E.; TALLANT, E.A.; GANTEN, D.; FERRARIO, C.M. Angiotensin II AT₁-receptor blockade inhibits monocyte activation and adherence in transgenic (mRen2)²⁷ rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 33(3):341-351, 1999.

SVEGLIATI-BARONI, G.; CANDELARESI, C.; SACCOMANNO, S.; et al. A model of insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis in rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and n-3 polyunsaturated fatty acid treatment on liver injury. **Am. J. Pathol.**, 169:846-60, 2006.

TALEB, S.; HERBIN, O.; AIT-OUFELLA, H.; VERRETH, W.; GOURDY, P.; BARATEAU, V.; MERVAL, R.; et al. Defective leptin/leptin receptor signaling improves regulatory T cell immune response and protects mice from atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 27:2691-2698, 2007.

TALLANT, E.A.; FERRARIO, C.M.; GALLAGHER, P.E. Angiotensin-(1-7) Inhibits Growth of Cardiac Myocytes Through Activation of the Mas Receptor. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, 289(4):H1560-1566, 2005.

TALUKDAR, S.; HILLGARTNER, F.B. The mechanism mediating the activation of acetyl- coen-zyme A carboxylase-alpha gene transcription by the liver X receptor agonist T0-901317. **J. Lipid. Res.**, 47:2451-2461, 2006.

TERASAKA, N.; HIROSHIMA, A.; KOIEYAMA, T.; UBUKATA, N.; MORIKAWA, Y.; NAKAI, D.; INABA, T. T-0901317, a synthetic liver X receptor ligand, inhibits development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. **FEBS Lett.**, 536:6-11, 2003.

TESANOVIC, S.; VINH, A.; GASPARI, T.A.; CASLEY, D.; WIDDOP, R.E. Vasoprotective and Atheroprotective Effects of Angiotensin (1-7) in Apolipoprotein E Deficient Mice. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 30:1-8, 2010.

THIELE, C.; HANNAH, M.J.; FAHRENHOLZ, F.; HUTTNER, W.B. Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. **Nat. Cell Biol.**, 2:42-9, 2000.

THOMAS, M.C.; PICKERING, R.J.; TSOROTES, D.; KOITKA, A.; SHEEHY, K.; BERNARDI, S.; et al. Genetic Ace 2 deficiency accentuates vascular inflammation and atherosclerosis in the ApoE knockout mouse. **Circ. Res.**, 107(7):888-97, 2010.

TIPNIS, S.R.; HOOPER, N.M.; HYDE, R.; KARRAN, E.; CHRISTIE, G.; TURNER, A.J. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. **J. Biol. Chem.**, 275(43): 33238-43, 2000.

TORDJMAN, K.; BERNAL-MIZRACHI, C.; ZEMANY, L.; WENG, S.; et al. PPAR α deficiency reduces insulin resistance and atherosclerosis in apoE-null mice. **J. Clin. Invest.** 107:1025–1034, 2001.

TRAYHURN, P.; DUNCAN, J.S.; RAYNER, D.V.; HARDIE, L.J. Rapid inhibition of ob gene expression and circulating leptin levels in lean mice by the beta 3-adrenoceptor agonists BRL 35135A and ZD2079. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 228:605-10, 1996.

UNGER, R.H.; ORCI, L. Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, 24(Suppl.4):S28-32, 2000.

URATA, H.; KINOSHITA, A.; MISONO, K.S.; BUMPUS, F.M.; HUSAIN, A. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. **J. Biol. Chem.**, 265:22348–57, 1990.

VAN ES, T.; VAN PUIJVELDE, G.H.; FOKS, A.C.; et al. Vaccination against Foxp3(+) regulatory T cells aggravates atherosclerosis. **Atherosclerosis** 209(1): 74-80, 2010.

VAN RAALTE, D.H.; LI, M.; PRITCHARD, P.H.; WASAN, K.M. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)- α : A Pharmacological Target with a Promising Future. **Pharmaceutical Research**, 21(9):1531-8, 2004.

VANNI, E.; BUGIANESI, E.; KOTRONEN, A.; DE MINICIS, S.; YKI-JÄRVINEN, H.; SVEGLIATI-BARONI, G. From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? **Digestive and Liver Disease**, 42:320-330, 2010.

VIDELA, L.A.; RODRIGO, R.; ORELLANA, M.; FERNÁNDEZ, V.; TAPIA, G.; QUIÑONES, L.; VARELA, N.; CONTRERAS, J.; LAZARTE, R.; CSENDES, A.; ROJAS, J.; MALUENDA, F.; BURDILES, P.; DIAZ, J.C.; SMOK, G.; THIELEMANN,

L.; PONIACHIK, J. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. **Clin. Sci.**, 106:261-268, 2004.

VIGOUROUX, C.; CARON-DEBARLEA, M.; LE DOUR, C.; MAGRÉA, J.; CAPEAUA, J. Molecular mechanisms of human lipodystrophies: From adipocyte lipid droplet to oxidative stress and lipotoxicity. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 43:862-876, 2011.

VIRTUE, S.; VIDAL-PUIG, A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome - an allostatic perspective. **Biochim. Biophys. Acta** 1801(3):338-49, 2010.

VIRTUE, S.; VIDAL-PUIG, A. It's not how fat you are, it's what you do with it that counts. **PLoS Biology**, 6e237, 2008.

VU-DAC, N.; CHOPIN-DELANNOY, S.; GERVOIS, P.; BONNELYE, E.; MARTIN, G.; FRUCHART, J.C.; LAUDET, V.; STAELS, B. The nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor alpha and Rev-erbalpha mediate the species-specific regulation of apolipoprotein A-I expression by fibrates. **J. Biol. Chem.**, 273:25713-25720, 1998.

WALKER, L.C.; PARKER, C.A.; LIPINSKI, W.J.; CALLAHAN, M.J.; CARROLL, R.T.; GANDY, S.E.; et al. Cerebral lipid deposition in aged apolipoprotein-E-deficient mice. **The American Journal of Pathology**, 151:1371-7, 1997.

WALTHER, T.; WESSEL, N.; KANG, N.; SANDER, A.; MALBERG, H.; BADER, M.; VOSS, A. Gender-specific alterations of heart rate and blood pressure variability in Mas-deficient mice. **J. Clin. Bas. Cardiol.**, 2:281-282, 1999.

WALTHER, T.; WESSEL, N.; KANG, N.; SANDER, A.; TSCHÖPE, C.; MALBERG, H.; BADER, M.; VOSS A. Altered heart rate and blood pressure variability in mice lacking the Mas protooncogene. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 33(1):1-9, 2000.

WALTHER, T; BALSCHUN, D; VOIGT, JP; FINK, H; ZUSCHRATTER, W; BIRCHMEIER, C; GANTEN, D; BADER, M. Sustained long term potentiation and

anxiety in mice lacking the Mas protooncogene. **The Journal of Biological Chemistry**, 273:11867-11873, 1998.

WANLESS, I.R.; LENTZ, J.S. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. **Hepatology**, 12:1106-1110, 1990.

WIGREN, M.; BENGTSSON, D.; DUNER, P.; et al. Atheroprotective effects of Alum are associated with capture of oxidized LDL antigens and activation of regulatory T cells. **Circ. Res.**, 104(12):e62–70, 2009.

WILLY, P.J.; UMESONO, K.; ONG, E.S.; EVANS, R.M.; HEYMAN, R.A.; MANGELSDORF, D.J. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. **Genes Dev.**, 9:1033-1045, 1995.

WITZTUM, J.L.; STEINBERG, D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. **J. Clin. Invest.**, 88:1785-1792, 1991.

XU, P.; GONCALVES, A.C.C.; TODIRAS, M.; RABELO, L.A.; SAMPAIO, W.O.; MOURA, M.M.; SANTOS, S.S.; LUFT, F.C.; BADER, M.; GROSS, V.; ALENINA, N.; SANTOS, R.A.S. Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in Mas gene-deleted mice. **Hypertension**, 51:574–580, 2008.

YIN, M.; ZHANG, L.; SUN, X.; MAO, L.; PAN, J. Lack of apoE causes alteration of cytokines expression in young mice liver. **Mol. Biol. Rep.**, 37:2049-2054, 2010.

YOUNG, D; WAITCHES, G; BIRCHMEIER, C;FASANO, O; WIGLER, M. Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. **Cell**, 45:711-719, 1986.

YU, L.; CAO, G.; REPA, J.; STANGL, H. Sterol regulation of scavenger receptor class B type I in macrophages. **J. Lipid. Res.**, 45:889-899, 2004.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN J.M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, 372:425-32, 1994.

ZHANG, Y.; REPA, J.J.; GAUTHIER, K.; MANGELSDORF, D.J. Regulation of lipoprotein lipase by the oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. **J. Biol. Chem.**, 276:43018-43024, 2001.

ZHAO, C.; DAHLMAN-WRIGHT, K. Liver X receptor in cholesterol metabolism. **Journal of Endocrinology**, 204:233-240, 2010.