

Alterações nas ATPases transportadoras de Na⁺ em células de túbulos proximais renais de ratos obesos: envolvimento de vias relacionadas à Angiotensina II e à Angiotensina-(3-4)?

Rafael Luzes

Duque de Caxias 2020 **Rafael Luzes**

Alterações nas ATPases transportadoras de Na⁺ em células de túbulos proximais renais de ratos obesos: envolvimento de vias relacionadas à Angiotensina II e à Angiotensina-(3-4)?

Tese de Doutorado apresentado ao programa de biomedicina translacional (BIOTRANS) – UNIGRANRIO/UEZO/INMETRO, como parte da exigência para obtenção do título de Doutor em ciência biomédicas

Orientadores: Adalberto Vieyra Paulo André da Silva

> Duque de Caxias 2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE UNIGRANRIO – NÚCLEO DE COORDENAÇÃO DE BIBLIOTECAS

L979a Luzes, Rafael.

Alterações nas ATPases transportadoras de Na+ em células de túbulos proximais renais de ratos obesos : envolvimento de vias relacionadas a angiotensina II e a angiotensina – (3-4) / Rafael Luzes . – 2020. 105 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Biomedicina Translacional) – Universidade do Grande Rio "Prof. José de Souza Herdy", Escola de Escola de Ciências da Saúde, Duque de Caxias, 2020.

"Orientadores: Adalberto Vieyra e Paulo André da Silva". Referências: f.75.

1. Obesidade. 2. Hipertensão. 3. Sistema Renina - Angiotensina. I. Vieyra, Adalberto. II. Silva, Paulo André da. III. Universidade do Grande Rio "Prof. José de Souza Herdy". IV. Título.

CDD - 610.28





ATA DE DEFESA DE TESE

grama de Pós-Graduação em iomedicina Translacional Mestrado e Doutorado

Às 14 horas, do dia vinte de abril de 2020, o Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional realizou sessão em ambiente virtual de Defesa da Tese de Doutorado intitulada "Alterações nas ATPases transportadoras de Na+ em células de túbulos proximais renais de ratos obesos: envolvimento de vias relacionadas à Angiotensina II e à Angiotensina-(3–4)?", de autoria de Rafael Luzes Pereira, sob orientação dos Professores Adalberto Ramon Vieyra e Paulo André da Silva. A sessão foi aberta pela Prof.ª Cláudia Maria Pereira, presidente da Comissão, que nos termos regimentais convocou os demais Membros da Comissão Examinadora: Prof.ª Lucienne da Silva Lara Morcillo, Prof.ª Isis Hara Trevenzoli e Prof. Fabio da Silva de Azevedo Fortes. Em seguida, passou à palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Após a apresentação, o candidato foi arguido pelos examinadores e suas respostas foram consideradas satisfatórias.

A presidente declarou o doutorando Rafael Luzes Pereira **APROVADO**, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biomédicas, de acordo com o Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional do convênio tripartite entre UNIGRANRIO, INMETRO e UEZO. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a sessão, em que foi lavrada a presente ata, que será assinada pelos Membros da Comissão Examinadora.

Duque de Caxias, 20 de abril de 2020.

Prof.^a Dr.^a Cláudia Maria Pereira Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO Presidente da Banca

huismu da silva herra percillo

Prof.^a Dr.^a Lucienne da Silva Lara Morcillo Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Hara Trevensoli

Prof.^a Dr.^a Isis Hara Trevenzoli Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Prof. Dr. Fabio da Silva de Azevedo Fortes Centro Universitário da Zona Oeste – UEZO

Prof.^a Dr.^a Carina Maciel da Silva Boghossian Coordenadora Geral do Programa Pós-Graduação em Biomedicina Translacional – BIOTRANS







(iii) Aprovado com Ressalvas e Modificações
Comentários:
Presidente: Claudia Jania Amira

Dedico esta tese a todos que vieram antes de mim e pavimentaram os caminhos que escolhi seguir, mesmo em dias nebulosos.

Agradecimentos

Ao programa de Biomedicina translacional junto com todo seu corpo docente e equipe administrativa que me acolheram entre os seus e me ajudaram a redescobrir os prazeres e belezas da ciência.

Á CAPES, CNPq e principalmente a FAPERJ por terem proporcionado o fomento necessário para o desenvolvimento deste trabalho. A luta dessas instituições é um exemplo a ser seguido, ainda mais em dias que o conhecimento parece ter perdido seu valor.

Á Universidade Federal do Rio de Janeiro que manteve sempre as portas abertas para todo e qualquer aluno que estivesse buscando conhecimento, foi aonde aprendi que o conhecimento é um bem público e como tal deve ser compartilhado. Uma instituição que permanece inquebrantável mesmo contra ventos tão fortes.

Á UNIGRANRIO pela sua iniciativa de estimular a pesquisa e a geração de novos conhecimentos sendo um pilar que emerge no ensino privado do Rio de Janeiro.

Agradeço a cada uma dos animais utilizados durante este trabalho, foram eles que deram sua vida para que pudéssemos obter cada resultado.

Ao professores Emílio Antônio Francischetti e Virginia Genelhu pela inspiração e por compartilharem um pouco de seu conhecimento e experiencias de vida.

Á todos os alunos que participaram de forma direta no desenvolvimento desta tese, Heather Gandara, Igor Alencar, Karine Coimbra, Leonardo da Mata, Matheus Gonçalvez, Thuany Thaliny, Roxane Iack e Leticia Cabral. Que os caminhos de vocês sejam iluminados como tem sido o meu até aqui.

Ao excelente grupo do Laboratório de Físico-Química Biológica Aída Hassón Voloch, tanto aos membros que já passaram quanto aos atuais. Só há uma coisa a dizer "que grupo".

Á três pessoas que fizeram estes anos de trabalho duro parecem mais leves e que com o passar do tempo se tornaram membros que escolhi para minha família, Jarlene Alécia, Thuany Thaliny e Priscila Dantas. Amo muito vocês meninas. Á Humberto Muzi e Amaury Acácio pelos conselhos, orientações e discussões ao longo desses anos. Sem duvida uma dupla singular.

Á Glória Sarmento que é sempre uma luz de sanidade em meio a nossa loucura diária.

Aos meus pais e minha avó por me aturarem, não só nesse período mas em toda a vida, sei que não sou fácil.

Á toda a equipe de funcionários que estiveram comigo seja resolvendo pendencias administrativas, fazendo a segurança quando saia de madrugada após os experimentos ou ajudando na limpeza do nosso ambiente de trabalho.

Á todos que passaram pela minha vida e colocaram sua contribuição para que eu continuasse a caminhar. Principalmente a Natalia Abranche que me empurrava todas as vezes que eu pensava em desistir.

"É um negócio perigoso, Frodo, cruzar sua porta. Você pisa na estrada, e, se não controlar seus pés, não há como saber até onde você pode ser levado".

J.R.R. Tolkien

Resumo

Relevância. A obesidade e o sobrepeso constituem uma das grandes pandemias do século XXI, que se expande tanto em países desenvolvidos quanto em regiões com baixo desenvolvimento econômico e social, tendo a hipertensão arterial – também em expansão – como uma de suas principais co-morbidades.

Objetivos. Investigar as características de uma associação entre evolução da massa corporal (BM), deposição de tecido adiposo visceral, modificações da pressão arterial e alterações da homeostasia corporal de Na⁺ no contexto do possível estabelecimento de uma síndrome metabólica em ratos jovens. Para isto, os animais foram alimentados com uma dieta hipercalórica e hiperlipídica, enriquecida de Na⁺ até uma idade equivalente à do final da adolescência em humanos, investigando a influência da Ang-(3–4) um potente antagonista dos efeitos de Ang II.

Metodologia. Ratos Wistar machos (58 dias de vida) foram expostos a duas dietas diferenciadas: (i) controle (CTR) seguindo as normas AIN-93 e (ii) hipercalórica e hiperlipídica (HL), na qual 70% das calorias são provenientes de lipídeos, e cujo conteúdo de Na⁺ foi 32% e 56% maior (em relação ao CTR) em duas criações sucessivas. Aos 104 dias os ratos foram individualizados em gaiolas metabólicas para receber – ou não – quatro doses de Ang-(3–4) por via oral (80 mg/kg BM), em intervalos de 12 h, estabelecendo-se quatro grupos: CTR, HL, CTR+Ang-(3–4), HL+Ang-(3–4).

Resultados. Ao longo de 106 dias foi sendo estabelecida uma diferença progressivamente maior na massa corporal (BM) dos ratos HL em relação ao CTR, alçando um sobrepeso de 17% ao final do período. Os ratos HL também apresentaram um acentuado aumento de tecido adiposo perirrenal (50%) e epididimal (80%), este um marcador de modificações na gordura visceral, com adipócitos de maior tamanho. Os ratos HL desenvolveram uma moderada hipertensão: pressão arterial sistólica (PAS) de 140 vs 131 mmHg nos ratos CTR, que retornou para os valores destes (128 mmHg) após administração de Ang-(3-4). As ingestas calórica e de Na⁺ dos ratos HL foram semelhantes às dos ratos CTR; porém, a excreção urinária de Na⁺ em 24 h (U_{Na}V) foi inferior nos ratos HL. Estes tiveram um acentuado balanço positivo (Ingesta de Na⁺ - U_{Na}V \approx 0,6 meguiv Na⁺/24 h/100 g BM vs \approx 0,1 no grupo CTR) que se tornou negativo (≈-0,5 meguiv Na⁺/24 h/100 g BM) após a administração de Ang-(3-4), ao provocar uma acentuada redução da ingesta, sem mudança na U_{Na}V. A [Na⁺]_{pls} dos ratos HL foi significativamente menor que a dos ratos CTR (142 vs 147 mM) mesmo com ingesta semelhante, retornando para os níveis destes últimos após a administração de Ang-(3–4), apesar do acentuado balanço negativo de Na⁺ que ela provocou. A atividade da (Na⁺+K⁺)-ATPase de túbulos proximais se encontrava aumentada nos túbulos contornados proximais (~63%) e no ramo ascendente grosso da alça de Henle na mesma proporção. A Na⁺-ATPase resistente à ouabaína aumentou em $\approx 40\%$ em túbulos proximais. Em ratos HL que receberam Ang-(3–4) todas as atividades retornaram para os valores CTR, que no tiveram suas atividades modificadas pela administração do peptídeo. A dieta HL levou à um aumento na densidade de receptores de Ang II do tipo 1 (AT1R) (≈80%) e a uma diminuição da

densidade dos receptores do tipo 2 (AT₂R) em \approx 30%. Após Ang-(3–4), a densidade de AT₁R retornou aos níveis dos ratos CTR, sem mudanças nestes últimos. A infrarregulação de AT₂R não foi modificada. As alterações descritas se inseriram num quadro de síndrome metabólica, com glicemia no jejum aumentada levemente (\approx 20%), aumento da resistência à insulina (aumento da área abaixo da curva glicêmica HL de \approx 15%, lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade aumentadas (\approx 80%) e as de alta densidade diminuídas (\approx 50%). Os triglicerídeos diminuíram em (\approx 35%), possivelmente como resultado da intensa deposição no tecido adiposo visceral. A estas alterações se somou um significativo aumento do ácido úrico plasmático (\approx 100% mais alto que no CTR) que retornou aos valores dos ratos CTR após Ang-(3–4) sem, novamente, influenciar a uricemia destes.

Conclusões. Uma dieta hipercalórica rica em lipídeos, com um conteúdo de Na⁺ mais alto que o normal, a ratos jovens induziu uma moderada, hipertensão arterial sistólica, possivelmente como resultado de alterações na distensibilidade dos grandes vasos. A Ang-(3-4) reverteu o guadro hipertensivo, indicando que o mecanismo subjacente dependia de ativação do sistema renina-angiotensina (RAS). A diminuída [Na⁺]_{pls} encontrada com um balanço positivo de Na⁺ aumentado 5 vezes e hiperatividade das ATPases transportadoras de Na⁺ em túbulos renais é indicativa de que estes ratos foram acumulando lentamente Na⁺ em compartimentos osmoticamente silenciosos, formados por glicosaminoglicanos, ao longo do período em que foram desenvolvendo sobrepeso e se tornando hipertensos. Pode ser concluído ainda que o Na⁺ foi mobilizado destes compartimentos e eliminado na urina - apesar do acentuado balanço negativo em decorrência de uma ingesta fortemente inibida - como resultado do retorno das atividades das ATPases transportadoras de Na⁺ nos túbulos renais para valores CTR. O perfil lipídico correspondeu ao de uma síndrome metabólica com a diminuição de triglicerídeos plasmáticos podendo ser atribuído a uma acentuada deposição em adipócitos alterados da gordura visceral. A hiperuricemia pode ser atribuída a um aumento da reabsorção que, assim como no caso da suprarregulação das ATPases de Na⁺, decorre da hiperatividade do RAS renal e sistêmico. Em síntese, pode ser concluído que um RAS hiperativado, em decorrência de uma excessiva quantidade de calorias provenientes de uma dieta com alto teor de gordura e Na⁺, pode ser contrarregulado pelo mais curto peptídeo derivado de angiotensinas atuando somente em microambientes pró-hipertensivos, com potenciais aplicações para o tratamento de elevada pressão arterial em humanos.

Palavras-chave. Obesidade associada à hipertensão – Sistema renina-angiotensina – Ang-(3–4) – Suprarregulação de ATPases renais transportadoras de Na⁺ – Acúmulo de Na⁺ em compartimentos osmoticamente silenciosos

Abstract

Background. Obesity and overweight are the great pandemic at the beginning of the 21st century, which is growing in both developed and developing countries. Hypertension, which is also expanding worldwide, is one of the most important co-morbidities of obesity/overweight.

Objectives. Investigate the possible association among evolution of body mass (BM), accumulation of visceral fat, modifications in blood pressure and alterations in corporal Na⁺ homeostasis in the context of a possible metabolic syndrome in young rats. The animals received a hypercaloric and hyperlipidic diet containing high Na⁺ up to an age equivalent to adolescence in humans. We also aimed to investigate the effects of Ang-(3–4) a potent antagonist of the Ang II actions in several processes and systems.

Methods. Male Wistar rats (aged 58 days) received two types of diets: (i) control (CTR) according to AI-93 recommendations and (ii) hypercaloric and hyperlipidic (HL) (70% of the calories from lipids), also containing 32% and 56% more Na⁺ than the CTR diet, in two successive breedings. Growing was followed during 104 days and BM was recorded weekly. At day 104 the rats were housed in metabolic cages and received, or not, four oral doses of Ang-(3–4) (80 mg/kg BM) at 12 h intervals. Thus four groups were formed: CTR, HL, CTR+Ang-(3–4), HL+Ang-(3–4).

Results. The progressive increase in BM was higher in HL rats when compared to the CTR group; an overweight of 17% was found at the end of the period of 106 days. They also presented with increased visceral adipose tissue: and increase of 50% and 80% was found in the perirenal and epididymal fat, respectively, showing adipocytes of augmented size. HL rats developed moderate hypertension: systolic arterial pressure (SAP) of 140 mmHg vs 131 mmHg in the CTR. SAP in HL decreased to 128 mmHg after Ang-(3-4) administration. Both groups consumed the same amount of calories and Na⁺; however, the urinary Na⁺ excretion in 24 h (U_{Na}V) was lower in HL rats and the daily Na⁺ balance was remarkably positive (Na⁺ intake - $U_{Na}V \approx 0.6$ mequiv Na⁺/24 h/100 g BM vs \approx 0,1 in the CTR group), and became negative after Ang-(3–4) administration (\approx -0,5 mequiv Na⁺/24 h/100 g BM), as the result of the remarkably reduction of Na⁺ intake without modification of U_{Na}V. The [Na⁺]_{pls} in HL rats was lower than in CTR rats (142 vs 147 mM) even though the intake was similar, and returned to CTR levels after Ang-(3–4) administration, despite the negative Na⁺ balance it induced. The (Na⁺+K⁺)-ATPase activity of renal proximal tubules increased \approx 63% and in the same proportion in the thick ascending limb. After Ang-(3-4) administration the activities dropped to CTR values, which were not modified by the peptide. Upregulation of Na⁺ transporting ATPases in HL membranes was accompanied by an increased density of type 1 Ang II receptors (AT₁R) (\approx 80%), with simultaneous decrease of type 2 Ang II receptors (\approx 30%). After Ang-(3–4), the abundance of AT₁R decreased to CTR levels, which again showed no modification by the peptide. The downregulation of AT₂R remained unchanged. The HL rats developed metabolic syndrome. Fasting glucose slightly increased by 20% (though significantly) with increased insulin resistance (the total area under the HL glycemic curve increased $\approx 15\%$) together with

an augment (\approx 80%) and a decrease (\approx 35%) of low density and high density lipoproteins, respectively. We encountered a puzzling decrease in triglycerides, likely due to their intense recruitment by visceral adipose tissue. Together with the above alterations, HL presented with higher concentrations of uric acid in plasma (\approx 100% higher than CTR), which returned to the levels of CTR after Ang-(3–4). Again, no effect was encountered in the case of CTR rats.

Conclusions. The hypercaloric and hyperlipidic diet containing higher Na⁺ than the CTR diet led to moderate systolic hypertension in young rats, possibly by altering the distensibility of large vessels (decreased compliance). That Ang-(3-4) normalized blood pressure is indicative that the diet led to activation of the renin-angiotensin system. The decreased [Na⁺]_{pls}, that was found with simultaneous 5-times higher positive Na⁺ balance and hyperactivation of renal Na⁺ transporting ATPases, indicates that the HL rats gradually accumulated Na⁺ in osmotically inactive compartments formed by glycosaminoglycans structures, during the 106 days period in which they developed overweight and hypertension. Moreover, one can conclude that Na⁺ was mobilized from these compartments and then eliminated in the urine - despite the remarkable negative balance as the result of a strongly inhibited intake - due to the Ang-(3-4)-induced decrease in the activities of renal tubules Na⁺ transporting ATPases. The plasma lipid profile was that usually found in metabolic syndromes, except for the decreased triglycerides likely due to the intense depot in metabolically altered adipocytes from the visceral fat. The hyperuricemia could be attributed to an increased reabsorption of uric acid in proximal tubule cells due to RAS activation, as in the case of Na⁺ transporting ATPases. In summary, it can be concluded that the hyperactive RAS, as a consequence of an excess of calories coming from the elevated dietary fat and potentiated by the high Na⁺, can be counteregulated by the shortest angiotensins-derived peptide solely acting in a prohypertensive microenvironment, with potential applications for the treatment of elevated blood pressure in humans. Keywords. Obesity-associated hypertension – renin-angiotensin system – Ang-(3–4) - Upregulation of renal Na⁺ transporting ATPases - Na⁺ accumulation in osmotically silent compartments.

Lista de llustrações

FIGURA 1. Aumento da incidência de obesidade em diferentes países do mundo 1975–201610
FIGURA 2. Projeção de aumento da prevalência de sobrepeso e obesidade na população adulta dos Estados Unidos11
FIGURA 3. Taxas de sobrepeso e obesidade (IMC > 25 kg/m2) nas diferentes regiões do Brasil
FIGURA 4 . Expansão da obesidade no mundo em crianças e adolescentes (5–19 anos) de ambos os sexos entre 1975 e 201616
FIGURA 5. Percentual da população em estado de desnutrição e obesidade em 2016 18
FIGURA 6. Sindemia global de obesidade, desnutrição e mudanças climáticas20
FIGURA 7. Interações das células do tecido adiposo branco
FIGURA 8. Mecanismos de hipertensão associados à obesidade25
FIGURA 9. Resumo dos mecanismos propostos para o início do desenvolvimento de hipertensão e lesão renal na obesidade
FIGURA 10. Acumulação de Na ⁺ em redes intersticiais de glicosaminoglicanos estruturalmente organizados em proteoglicanos
FIGURA 11. Glicocálix endotelial

FIGURA 13. Ratos alimentados com a dieta HL desenvolvem massa corporal maior que os ratos alimentados com a dieta CTR42

FIGURA 15. Aumento do tamanho celular em adipócitos da gordura epididimal e perirenal dos ratos com sobrepeso45

 FIGURA 27. Os níveis de colesterol total no plasma de ratos com sobrepeso que receberam a dieta HL são semelhantes aos dos ratos CTR70

FIGURA 29. Leve hiperglicemia no jejum e tolerância à glicose diminuída em ratos HL

Lista de tabelas

TABELA 1. Composição das dietas controle	e (CTR) e high lipid (HL)33
--	-----------------------------

Lista de abreviaturas e siglas

ACE	: Enzima conversora de angiotensina
AD	: Distensibilidade da aorta
Ang II	: Angiotensina II
Ang-(1–7)	: Angiotensina-(1–7)
Ang-(3–4)	: Angiotensina-(3–4)
AT₁R	: receptor de angiotensina II do tipo 1
AT₂R	: Receptor de angiotensina II do tipo 2
BM	: Body mass
cAMP	: Adenosina monofosfato cíclico
CTR	: Grupo controle
EDTA	: Ethylenediamine tetraacetic acid
GDP	: Produto interno bruto do mundo
GHG	: Greenhouse gases
HL	: Grupo high lipid
Htr2c	: Receptor 2c para serotonina
IMC	: Índice de massa corporal
LPBM	: Núcleo parabraqueal lateral
MC	: Massa corporal
[Na ⁺] _{pls}	: Concentração de sódio plasmático
NHI	: National Institutes of Health
OMS	: Organização mundial da saúde
PAD	: Pressão arterial diastólica
PAS	: Pressão arterial sistólica
PIB	: Produto interno bruto
РКА	: Proteína quinase A
РКС	: Proteína quinase C
PMSF	: phenylmethylsulfonyl fluoride
POMC	: Pró-opiomelanocortina

Tecido adipose perivascular
Receptores de mineralocorticoides
Dodecil sulfato de sódio
Ratos espontaneamente hipertensos
Sistema nervoso central
Sistema nervoso simpático
Sistema renina angiotensina
Sistema renina angiotensina aldosterona
Sistema único de saúde
Sódio urinário em 24 h

Sumário

1. INTRODUÇÃO	.8
1.1 Panorama de obesidade no mundo	.8
1.2 Impactos da obesidade na saúde e econômicos	9
1.3 A obesidade compondo a Sindemia Global1	5
1.4 Tecido adiposo e inflamação no contexto da obesidade1	9
1.5 Hipertensão associada à obesidade: mecanismos que envolvem os rins, gordura visceral, o sistema renina-angiotensina-aldosterona e o sistem nervoso simpático	a ia 2
1.6 Na⁺: O terceiro elemento da trilogia2	24
1.7 O sistema renina-angiotensina renal na gênese da hipertensão associad a alterações no transporte intrarrenal de Na ⁺ 2	a 8
2. OBJETIVOS	1
2.1 Objetivo geral3	51
2.2 Objetivos específicos	1
3. MATERIAIS E MÉTODOS	2
3.1 Protocolo de experimentação com animais	2
3.2 Analise morfológica da gordura visceral	5
3.3 Analise de fibrose renal em ratos CTR e HL3	5
3.4 Medida da pressão arterial sistólica3	6
3.5 Determinação do conteúdo de Na⁺ na ração e de sua concentração na amostras de plasma e urina3	ıs 6
3.6 Glicemia no jejum e investigação da tolerância à glicose	57
3.7 Isolamento das frações de membrana de túbulos proximais e de medul externa renal	a 7
3.8 Determinação da atividade da (Na⁺+K⁺)-ATPase sensível a ouabaína e d Na⁺-ATPase resistente à ouabaína e sensível a furosemida	a 8
3.9 SDS-PAGE e Western blotting	8
3.10 Estudo do perfil lipídico plasmático3	9
3.11 Medida do ácido úrico plasmático3	;9

3.12 Analise estatística40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO41
4.1 A administração de dieta hiperlipídica induz sobrepeso com significativo aumento da gordura visceral em ratos jovens
4.2 A dieta hiperlipídica levou a um quadro hipertensivo sensível à Ang-(3–4) 46
4.3 Ang-(3–4) diminui a ingesta de alimento, de energia e de Na⁺ em ratos com sobrepeso, mas não em ratos CTR52
4.4 Balanço corporal de Na ⁺ em ratos com sobrepeso: positivo e alto, se tornando acentuadamente negativo após administração de Ang-(3–4)
4.5 Transporte ativo de Na ⁺ aumentado em túbulos proximais renais de ratos com sobrepeso: retorno aos valores CTR após administração de Ang-(3–4)
4.6 O sobrepeso, a hipertensão e as alterações da homeostasia corporal de Na⁺ que a dieta hiperlipídica provoca fazem parte de uma síndrome metabólica
5. CONCLUSÕES, SIGNIFICADO E LIMITAÇÕES
5.1 Conclusões75
5.2 Significado75
5.3 Limitações76
6. REFERÊNCIAS

1. Introdução

1.1. Panorama de obesidade no mundo

A obesidade passou a ser considerada um dos mais severos problemas de saúde pública tanto nos países desenvolvidos – especialmente no Hemisfério Norte – quanto, mais recentemente, nos países em desenvolvimento, e hoje é considerada uma das grandes epidemias contemporâneas (Hruby *et al.*, 2015; Xie & Bollag, 2016; West-Eberhard, 2019) pela prevalência e pela crescente incidência, como o mostra a Figura 1. Em 2014, a Organização Mundial da Saúde estimou a existência de em torno de 2 bilhões de adultos com sobrepeso em todo o mundo, para uma população total de pouco mais de 7 bilhões, sendo que destes mais de 600 milhões eram considerados obesos (Xie & Bollag, 2016); ou seja com um índice de massa corporal (IMC) \geq 30 kg/m² (um IMC \geq 25 kg/m² é aquele que define o sobrepeso em adultos). Pouco mais de uma década atrás havia sido alertado que, se a tendência secular se mantiver, ao se chegar a 2030 em torno de 40% da população adulta mundial apresentaria sobrepeso e 20% seria obesa (Wang *et al.*, 2008, cf. Hruby et al., 2015).

Nos países desenvolvidos, nos quais a obesidade é facilmente associada ao crescimento econômico, à industrialização, ao transporte mecanizado, à urbanização, ao sedentarismo em aumento e ao crescente consumo de alimentos processados, o percentual de adultos obesos dobrou o quadruplicou nos últimos 30 anos (Hruby *et al.*, 2015). Nos Estados Unidos de América, projeta-se que em 2030 mais de 50% da população adulta seja obesa e que em torno de 90% apresente sobrepeso (Figura 2) e em 2048 todos os americanos adultos terão sobrepeso ou serão obesos (Wang *et al.*, 2008), se as condições sociais e o estilo de vida das populações forem mantidos. Este ponto será retomado pouco mais adiante desde uma nova perspectiva.

A transição do conceito de obesidade de "epidemia" para o de "pandemia" começou quando se comprovou uma tendência similar de crescimento – embora com uma quantificação e uma projeção menos precisas – nos países em desenvolvimento, incluindo aqueles de condições econômicas que causam grandes privações (Hoffman, 2004; Bhurosy & Jeewon, 2014). Nesses países também houve, nos últimos 30 anos, importante mudanças demográficas, ambientais, econômicas e culturais que propiciaram um progressivo aumento da incidência de obesidade. Já no início deste século (Hoffman, 2004), começou a ser apontada a mudança da dieta em países em

desenvolvimento em termos de mais gordura, mais comida, mais açúcar e maiores porções, contribuindo para o que passou a ser chamada de "transição nutricional", uma combinação de acesso aumentado aos alimentos com atividade física diminuída.

Em função das precárias condições socioeconômicas predominantes para as populações destes países, o custo dos alimentos passou a governar em boa parte – junto com as condições de oferta – as escolhas alimentares, favorecendo a utilização de carboidratos e gorduras, dentre estas especialmente as *trans*-saturadas (Bhurosy & Jeewon, 2014). No contexto da presente tese, deve ser mencionado como alteração adicional da composição alimentar que contribui para a etiopatogenia de co-morbidades associadas à obesidade a elevada ingesta de Na⁺, como é caso do Brasil, onde a média do consumo de NaCl é quase o dobro do recomendado pela Organização Mundial da Saúde (Mill *et al.*, 2019).

1.2. Impactos da obesidade na saúde e econômicos

Os custos médicos da obesidade são extremamente altos e cresceram com ritmo acelerado nos últimos anos. Apenas nos Estados Unidos da América eles aumentaram de aproximadamente 80 bilhões de dólares anuais em 1998 para 150 bilhões em 2008 (Hammond & Levine, 2010), com uma projeção que os aproxima de 1 trilhão em 2030 (Wang *et al.*, 2008). As informações, escassas ou de registro não sistemático em países de baixo ou médio desenvolvimento econômico, não permitem ter uma visão quantitativamente rigorosa do impacto econômico da obesidade na maioria deles. Todavia com as informações referentes aos Estados Unidos da América, a estimativa de que em 2014 (Dobbs *et al.*, 2014; cf. Tremmel *et al.*, 2017) o peso econômico da obesidade correspondeu a mais de 2 trilhões de dólares no mundo (ou ~3% do PIB mundial), é possível concluir que nos países em desenvolvimento ele foi substancialmente alto, uma condição agravada pelas geralmente precárias condições de cuidados à saúde. Este peso econômico decorre do custo dos cuidados médicos propriamente ditos, do absenteísmo, da perda de produtividade, da morte precoce e da invalidez e daqueles intangíveis como a qualidade de vida.



Figura 1. Aumento da incidência de obesidade em diferentes países do mundo 1975–2016. Na abscissa estão apresentados os anos, na ordenada estão descritos os percentuais de indivíduos obesos de cada país acima de 18 anos (IMC > 30 kg/m²). Fonte: *Our World in Data, Oxford University*. Imagem acessada em 29 de janeiro de 2020 em <u>http://www.ourworldindata.org/obesity</u>. Para dados do Brasil, ver adiante Figura 3.



Figura 2. Projeção de aumento da prevalência de sobrepeso e obesidade na população adulta dos Estados Unidos. (A) Soma de sobrepeso e obesidade (IMC $\geq 25 \text{ kg/m}^2$). (B) Obesidade (IMC $\geq 30 \text{ kg/m}^2$). A partir da taxa de crescimento entre 1976 e 2004 (esquerda da linha vertical tracejada) é projetado o crescimento ao longo do século XXI com base num modelo de regressão linear (Wang *et al.*, 2008). Reproduzida com permissão de Wang *et al.* (2008).

Dentre as patologias associadas à obesidade se destacam a hipertensão – com suas repercussões no sistema cardiovascular como um todo – e a diabetes mellitus tipo 2, geralmente fazendo de um quadro mais amplo de alterações englobadas na chamada "síndrome metabólica" que inclui ainda alterações no colesterol e nos triglicerídeos, que aumentam o risco cardiovascular (Motillo *et al.*, 2010). Alguns tipos de câncer, principalmente de cólon (Kang *et al.*, 2011) têm sido também associados à obesidade. A obesidade abdominal, especialmente o aumento anormal da gordura visceral, um tecido com importantes funções imunes, é considerada hoje um fator de risco aumentado para as complicações associadas à obesidade (West-Eberhard, 2019).

No Brasil, onde a taxas de sobrepeso e obesidade são altas em todas as regiões, e em todas as faixas de idade (Figura 3), o seu crescimento nas últimas duas décadas pode ser considerado alarmante. Os dados referentes às porcentagens mostradas na Figura 3 foram confirmados por aqueles obtidos em 2018 na Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel, 2018), permitindo ainda comparações com anos anteriores, revelando assim esse crescimento, especialmente da obesidade. Esta atingia 12% da população em 2008, quase duplicando em 2018: 20%. O sobrepeso, que atingia 43% da população em 2006, passou para 56% em 2018, porcentagens que, no seu conjunto permitem o registro de aproximadamente 110 milhões de brasileiros com sobrepeso e de 40 milhões de obesos, com predomínio entre a população de baixa renda.

Em relação aos custos econômicos da obesidade e patologias associadas no Brasil, encontramos 3 estudos acadêmicos de metodologias diferentes com foco no tratamento ambulatorial e hospitalar no SUS (Sichieri *et al.*, 2007; Bahia *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2015) e uma revisão (Bahia & Araújo, 2014). Com base nos riscos relativos à obesidade (desfechos) existentes em bancos de dados internacionais e a prevalência de sobrepeso e obesidade acima mencionados, Bahia *et al.* estimaram que o SUS gasta anualmente mais de R\$ 3,5 bilhões no tratamento dessas patologias, uma porcentagem muito pequena do PIB (0,1% contra ~0,5% na Alemanha, por exemplo), claramente devida ao baixo investimento em saúde pública no Brasil. Não se encontraram dados referentes ao sistema de saúde complementar. Mesmo com a incorporação de itens, não incluídos no estudo de Bahia *et al.*, como cirurgia bariátrica, medicação, consultas médicas, ortopedia e próteses (de Oliveira *et al.*, 2015), os gastos no Brasil com a obesidade e suas patologias associadas são modestos quando comparados com os de países desenvolvidos.

A Figura 3 antecipou altas porcentagens de obesidade infantil e juvenil no Brasil. Esta é também uma realidade mundial: a obesidade infantil aumentou 10 vezes nos últimos 40 anos entre crianças e adolescentes (NCD-RisC., 2017) (Figura 4). Para além da crescente incidência per se, a obesidade infantil é considerada um grave quadro, preditor de toda uma vida nas mesmas condições de sobrepeso ou obesidade com suas complicações (Singh et al., 2008) uma vez que: (i) a perda de peso e a manutenção desse estado após a perda é difícil de conseguir (MacLean et al., 2015); (*ii*) antecipa o risco de aparecimento precoce de doenças crônicas como a diabetes tipo 2 (Must et al., 2010; Park et al., 2012); (iii) a obesidade na infância e na adolescência tem adversas consequências psicossociais e baixo aproveitamento escolar (Lobstein et al., 2004; Caird et al., 2013; Quek et al., 2017). Numa dimensão que será retomada novamente mais adiante, há relações entre as experiências de uma criança em seu ambiente (como por exemplo, maltrato) e o desenvolvimento de obesidade (Danese & Tan, 2014). Para além do aumento da incidência de desfechos metabólicos como a diabetes tipo 2, o risco cardiovascular na idade adulta, associado ou não a uma síndrome metabólica, aumenta significativamente, como o demonstra a avaliação e comparação de diferentes parâmetros circulatórios (Nadeau et al., 2011).

Numerosos estudos focam, em diferentes países e regiões do mundo, relações entre diminuição da desnutrição e o aumento da obesidade. E embora esses processos existam com essa vetorialidade (NCD-RisC., 2017), a desnutrição constitui ainda uma outra epidemia de distribuição universal, especialmente entre os países menos desenvolvidos e em regiões pobres ou conflitadas de países desenvolvidos (Malik *et al.*, 2013), incluindo regiões rurais e grandes regiões metropolitanas como as encontradas no Brasil, onde coexiste com altas taxas de obesidade (Conde & Monteiro, 2014). A Figura 5 mostra que, junto às altas taxas de obesidade nos Estados Unidos da América, Arábia Saudita e Europa se encontram as extensas regiões com elevados índices de desnutrição, especialmente infantil, da África Subsaariana. E, novamente deve ser destacado que, em muitos países, as duas epidemias se sobrepõem.



Figura 3. Taxas de sobrepeso e obesidade (IMC > 25 kg/m²) nas diferentes regiões do Brasil. As cinco regiões são identificadas na cor verde. Os quadros correspondentes indicam porcentagens da população em faixas etárias diferentes (5 a 9 anos, 10 a 19 anos, adultos) com sobrepeso e obesidade. Fonte: Abeso.org.br, acessado em 29 de janeiro de 2020 em http://www.abeso.org.br/atitude-saudável/mapa-obesidade.

Há outro elo entre obesidade e desnutrição para além de sua associação como duas pandemias contemporâneas. E ele pode ser resumido na seguinte constatação que vem do final do século passado: "o retardo do crescimento, atribuído a desnutrição durante a infância, encontra-se associado com obesidade em países em desenvolvimento" (Sawaya *et al.*, 1995; Popkin *et al.*, 1996; Schroeder *et al.*, 1999; cf. Hoffman, 2004). Esta associação constitui um exemplo de "programação metabólica", na qual privações nutricionais durante a vida intrauterina ou na primeira infância resultam em alterações metabólicas permanentes que aumentam o risco de resistência à insulina, hipertensão e obesidade na vida adulta (Baker, 1997a; Baker, 1997b). Mais recentemente, foi acrescentado a este conceito o da predisposição às mais diversas alterações inflamatórias que acompanham estas alterações (Ellulu *et al.*, 2017), especialmente intensas quando há aumentos significativos da gordura visceral (West-Eberhard, 2019).

A programação de obesidade por desnutrição e retardo do crescimento se acentua por causas que aumentam o risco. Uma delas é a associação entre urbanização e modificações de hábitos alimentares e comportamentais como os da substituição de dietas ricas em frutas, vegetais e legumes com poucos alimentos processados e ricos em açúcar por alimentos ricos em gorduras, processados, com alto conteúdo de carboidratos (Popkin *et al.*, 1996; Caballero & Rubinstein, 1997) e, frequentemente, alto conteúdo de sal, como já mencionado acima (Mill *et al.*, 2019). Estes hábitos alimentares são frequentemente acompanhados de acentuada modificação de outros aspectos do comportamento, especialmente os relacionados à atividade e ao declínio progressivo da atividade física (Hoffman, 2004; Malik *et al.*, 2013).

1.3. A obesidade compondo a Sindemia Global

O quadro de coexistência de obesidade e desnutrição, de magnitude e características diferentes dependendo da região do mundo (NCD-RisC., 2017), passou a ser associado a outro grande desafio cuja relevância adquiriu reconhecimento em tempos recentes: o da pandemia representada pelas mudanças climáticas (Swinburn *et al.*, 2019). Emerge assim o conceito de "sindemia" (Figura 6), conjunto sinérgico das 3 pandemias que hoje afetam todos os indivíduos em todas as regiões do mundo: desnutrição, obesidade e mudanças climáticas. Esta associação já é considerada ca-





Figura 4. Expansão da obesidade no mundo em crianças e adolescentes (5–19 anos) de ambos os sexos entre 1975 e 2016. (A): 1975. (B): 2016. O aumento da intensidade da cor verde indica aumento da prevalência de obesidade no período. Fonte: OMS, acessado em 29 de janeiro de 2020; http://who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight_obesity/obesity_adolescents/en/.

-tastrófica, pelo especialmente forte impacto na infância (Pacheco, 2020).

O conceito de pandemias compondo uma sindemia implica no reconhecimento de 3 características: (i) elas ocorrem ao mesmo tempo e no mesmo lugar; (ii) elas interagem sinergicamente uma com as outras aos níveis biológico, psicológico, social e ambiental; (iii) elas compartilham fatores sociais indutores e subjacentes comuns (Singer, 2006; Swinburn *et al.*, 2019; Dietz, 2020), como pode ser apreciado na Figura 6. E estes fatores subjacentes comuns podem ser agrupados em 4 conjuntos interatuantes: (1) alimentos e agricultura, (2) transporte, (3) desenho urbano e (4) uso do solo.

Assim, as interações entre as 3 pandemias (obesidade desnutrição, mudanças climáticas) ocorrem ao nível de indivíduos e de populações em 4 conjuntos de sistemas/estruturas humanos mostrados na Figura 6: os microssistemas (contorno amarelo claro), os mesossistemas (contorno amarelo escuro), os macrossistemas (contorno laranja) e o sistema de governança (contorno vermelho), interceptando-se e com os sistemas naturais (centro verde), interações a partir dos quais se originam os indutores comuns.

Estas considerações nos remetem, agora de maneira conjunta, a resumir informações quantitativas a respeito do custo econômico já analisadas na subseção anterior. Obesidade e desnutrição afetam mais de 3 bilhões de pessoas em todo o mundo e 200 milhões de crianças têm seu crescimento reduzido, os custos da obesidade respondem por 3% do Produto Interno Bruto do mundo (GDP) e os custos da desnutrição na Ásia e na África variam entre 4 e 11% (Swinburn *et al.*, 2019; Dietz, 2020). Por fim, os custos das mudanças climáticas – que afetam de maneira desproporcionada os países pobres (Dietz, 2020) – representarão, se seu curso permanecer inalterado, mais de 7% do GDP em 2100 (Kahn *et al.*, 2019).

Se a primeira vista a relação entre desnutrição e mudanças climáticas aparece com clareza como, por exemplo, na relação entre desmatamento, desertificação e diminuição da oferta de alimentos, ela não é tão aparente no caso da associação de mudanças climáticas com obesidade. Encerraremos esta subseção apresentando um exemplo extraído de recente publicação (Dietz, 2020) mostrando que a obesidade e suas complicações podem ser associadas ao aumento dos gases do efeito estufa (GHG).



Share of the population that is undernourished, 2016

В

Share of adults that are obese, 2016 Obesity is defined as having a body-mass index (BMI) equal to or greater than 30. BMI is a person's weight in kilograms divided by his or her height in metres squared.



in Dat



Figura 5. Percentual da população em estado de desnutrição e obesidade em 2016. (**A**) Porcentual da população com desnutrição. Imagem acessada em 31 de janeiro de 2020: https://ourworldindata.org/hunger-and-undernourishment. (**B**) População com sobrepeso e obesidade. Imagem acessada em 31 de janeiro de 2020: http://www.ourworldindata.org/obesity. A barra horizontal em ambos os painéis mostra a correspondência entre cores das imagens nos mapas e porcentual da população em estado de desnutrição ou obesidade.

O autor destaca que o metano, um dos mais potentes GHG, produzido pelo gado para fazer frente às demandas crescentes pelo consumo de carne, é reconhecidamente associado à degradação do meio ambiente, gerando em torno de 10% dos GHG nos Estados Unidos da América e, por outro lado, o consumo exagerado de carne especialmente com gordura, acrescentamos – está associado com obesidade, doenças cardiovasculares e câncer de cólon. O autor prossegue apontando para o fato de que os padrões prevalentes de desenho urbano e uso do solo favorecem o uso de automóveis, que contribui para a obesidade ao induzir o abandono de transporte físico como a bicicleta e a caminhada, além de gerar quase 30% dos GHG no mesmo país. Por fim destaca - mostrando a tríplice associação que a Figura 6 apresenta através das setas na parte superior – que o desperdício de alimentos, frequente quando a oferta é excessiva, gera aproximadamente 8% dos GHG, concluindo que o aquecimento global causado pela produção crescente de GHG aumenta a frequência de catástrofes naturais e reduzem o conteúdo de proteínas e micronutrientes nas culturas, o qual contribui para a insegurança alimentar e a desnutrição em países e populações de baixa renda.

1.4. Tecido adiposo e inflamação no contexto da obesidade

A acumulação de tecido adiposo é um dos fenótipos mais característicos da obesidade decorrente de um balanço calórico positivo (Hill *et al.*, 2013). De uma forma ampla, o tecido adiposo é dividido em tecido adiposo marrom e tecido adiposo branco (Caron *et al.*, 2018), sendo que mais recentemente, passou a ser reconhecido o papel de um terceiro tipo de tecido adiposo: o bege (AlZaim *et al.*, 2020). O remodelamento patológico do tecido adiposo branco, com hipertrofia adipocitária, resistência a insulina e hipertensão – dentre outras manifestações – conjuntamente com inflamação crônica e acumulação de gordura visceral, constituem elementos fisiopatológicos da síndrome metabólica (Porro *et al.*, 2020). A localização do tecido adiposo e sua fisiopatologia, e especialmente o tipo de células inflamatórias e de citocinas secretadas determinar o tipo e a evolução de quadros patológicos associados à obesidade (AlZaim *et al.*, 2020), hoje considerada uma doença inflamatória crônica. As adipocinas, citocinas secretadas pelo tecido adiposo branco, são hormônios que regulam desde a resistência à insulina até a homeostasia calórica do organismo como um todo e, em obesos sem comorbidades,



Figura 6. Sindemia global de obesidade, desnutrição e mudanças climáticas. Interações entre as três pandemias ao nível de indivíduos e de populações em quatro conjuntos de sistemas humanos (microssistemas, mesossistemas, macrossistemas e de governança), que interagem entre si e com os sistemas naturais. A figura indica que a partir destes sistemas se originam indutores comuns para as três pandemias, consideradas desvios da saúde e do bem-estar humanos e da saúde e bem-estar ecológicos. Reprodução de painel de figura de Swinburn *et al.* (2019), com permissão. há um balanço entre adipocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.O aparecimento de comorbidades é sinal de predomínio de adipocinas pró-inflamatórias como leptina e lipocalina 2 (Mancuso, 2016; AlZaim *et al.*, 2020). Outro ponto importante são os efeitos da restrição calórica (a causa mais frequente de desnutrição) e da obesidade nas populações de leucócitos, secreção de adipocinas e inflamação crônica (Mancuso, 2016).

A inflamação e o acúmulo de gordura visceral em territórios específicos, como o perivascular, o pericardíaco e o perirenal, influenciam os perfis e o curso das que hoje são denominadas adisopatias (Su & Chang, 2020). Estes processos se acentuam quando associados a um disbalanço de adipocinas, como por exemplo entre leptina e adiponectina. Este o caso de patologias como a síndrome metabólica de modo geral (Pham & Park, 2020), diversos tipos de câncer associados à obesidade (Weihe *et al.*, 2020), o declínio cognitivo e o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas em pessoas obesas (Forny-Germano *et al.*, 2019). É considerado também um dos mecanismos que contribuem para o estabelecimento de hipertensão arterial sistêmica em homens e mulheres (Kim *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2015), num quadro de acúmulo de gordura visceral e inflamação perivascular e pericárdica. Possivelmente, as ações opostas de suas vias de sinalização a partir dos respectivos receptores ObR (leptina) e AdipoR1/2 (adiponectina) na produção de espécies reativas de O₂, desempenham um papel no curso do processo inflamatório no tecido adiposo visceral (Pham & Park, 2020).

Outro disbalanço entre citocinas que deve ser considerado por seu papel central na inflamação, inclusive aquela associada à hipertensão arterial, é aquele entre TNF-α e IL-6. Ambos são secretados por monócitos e macrófagos no local onde se instala um processo inflamatório (incluindo o tecido adiposo em quadros de obesidade), sendo que IL-6 é motivo de discussão há quase 40 anos acerca dos papeis que desempenha. Caracterizada inicialmente como uma citocina pró-inflamatória (Kopf *et al.*, 1994), estudos mais recentes demonstraram ações anti-inflamatórias no tecido adiposo e na síndrome metabólica de maneira geral (Mauer *et al.*, 2014), discrepâncias que poderiam ser explicadas pelo estágio do processo inflamatório (inicialmente pró-inflamatória e anti-inflamatória em estágios tardios) ou pela localização do processo (tecido adiposo ou músculo) (Fuster & Walsh, 2014). O efeito anti-inflamatório resultaria na ativação alternativa de macrófagos, levando a um aumento da população de macrófagos do tipo 2 (M2), de modo que as sinalizações

alternativas mediadas por TNF- α e IL-6 modulariam o número e a atividade células do sistema inflamatório com reflexos no sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) e na gênese de hipertensão arterial sistêmica (AlZaim *et al.*, 2020). Este aspecto específico será retomado no ponto seguinte.

A polarização de macrófagos para um fenótipo do tipo 1 (M1) acentua danos cardiovasculares, incluindo a gênese de hipertensão e o remodelamento do tecido cardíaco, enquanto que a polarização alternativa para M2 os atenua (Mouton *et al.*, 2020). Um passo importante antes do evento de polarização é o de mobilização dos macrófagos a partir dos reservatórios de células do sistema imune como resultado de alterações do chamado "eixo neuro-humoral". Estas alterações, moduladas por outros sistemas como o sistema nervoso simpático (SNS), sincronizaria essa liberação com a do seu depósito em territórios chave para a gênese de hipertensão arterial, como por exemplo a gordura visceral em torno dos rins (Francischetti & Genelhu, 2006; Hall *et al.*, 2015). Nesses territórios, os níveis de IL-6 desempenhariam um papel central na regulação da polarização de macrófagos (Harwani, 2018). A Figura 7 apresenta as complexas inter-relações entre células de tecido adiposo branco, células do sistema imune (incluindo os M1 e M2 nos extremos de espectro da população de macrófagos), citocinas pró- e anti-inflamatórias e o SNS.

1.5. Hipertensão associada à obesidade: mecanismos que envolvem os rins, a gordura visceral, o sistema renina-angiotensinaaldosterona e o sistema nervoso simpático

As Figuras 8 e 9 (Francischetti & Genelhu, 2006; Hall *et al.*, 2015) descrevem, resumindo observações de diferentes estudos, como se originam sinais e como se desencadeiam mecanismos a partir do tecido adiposo que culminam em hipertensão arterial sistêmica num cenário de síndrome metabólica. E, embora as figuras mostrem em geral efeitos unidirecionais, muitos deles se retroalimentam positivamente de forma mútua, agravando o processo de progressiva instalação do quadro hipertensivo. Na realidade, ao longo dos anos foram acumulando-se evidências de que, em maior ou menor grau, a maioria dos mecanismos e processos mostrados nas Figuras 7 e 8 interage entre si (Tanaka, 2006; Chandra *et al.*, 2014).


Figura 7. Interações das células do tecido adiposo branco. A figura apresenta algumas das complexas interações do tecido adiposo branco com o sistema nervoso simpático, através da secreção de leptina e a consequente modificação na resistência vascular periférica, resultando no estimulo à migração de macrófagos e monócitos, desencadeando mecanismos inflamatórios que irão favorecer a transformação e macrófagos M1 para macrófagos M2 nos locais de maior acúmulo das células adopoas.

O excesso de gordura em diferentes regiões do corpo, liberando ácidos graxos e leptina em quantidades aumentadas contribuem para a hiperatividade do SNS (Rayner & Trayhurn, 2001), já exacerbada pela produção, também aumentada, a partir de fatores que estimulam a liberação de mineralocorticoides e os níveis circulantes de aldosterona (Haynes, 2000). E, num circuito vicioso, o SNS e SRAA se estimulam mutuamente e levam a um aumento da reabsorção renal de Na⁺ (Pontes et al., 2015), com expansão do fluído do compartimento vascular, aumento do retorno venoso e do débito cardíaco o que, conjuntamente com aumento da resistência vascular periférica, leva ao aumento da pressão arterial sistólica e diastólica (Francischetti & Genelhu, 2006). Em outro exemplo de aditividade de processos que contribuem para o aumento da pressão arterial, o incremento nos níveis de aldosterona ativa seus receptores nos segmentos distais do néfron estimulando a reabsorção de Na⁺, promovendo uma orquestrada interação entre os diferentes mecanismos de transporte existentes na heterogênea população destes segmentos tubulares (Edwards & Crambert, 2017). Mais recentemente, foi demonstrado que a ativação destes receptores no sistema cardiovascular como um todo constitui um dos mecanismos centrais que levam ao estresse oxidativo, fibrose, inflamação e hipertensão (Buonafine et al., 2018).

O estímulo da secreção de citocinas pró-inflamatórias pela gordura visceral em excesso contribui para a alta resistência à insulina e as dislipidemias, bem como para a instalação de um quadro inflamatório generalizado e de lipotoxicidade (Garbarino & Sturley, 2009). No contexto da presente tese deve ser mencionado o estímulo, a partir da gordura visceral, da atividade de neurônios hipotalâmicos que produzem pró-opiomelacortina (POMC) (Figura 9) e que modulam a homeostasia energética corporal e a distribuição da adiposidade (de Araújo & Velloso, 2020), especialmente durante o consumo de dietas ricas em gordura (de Araújo *et al.*, 2019).

1.6. Na⁺: O terceiro elemento da trilogia

Um terceiro elemento deve ser considerado para compor uma trilogia com hipertensão e obesidade: as alterações no manejo renal de Na⁺ que foram identificadas, há quase duas décadas, como um elo entre obesidade abdominal e hipertensão (Strazzullo *et al.*, 2001). Como mostrado na figura 9, foi proposto que



Figura 8. Mecanismos de hipertensão associados à obesidade. Leptina, angiotensina e ácidos graxos livres aumentariam a atividade simpática e hipotalâmica. A aldosterona poderia aumentar a pressão arterial em quadros de obesidade, agindo sobre receptores de mineralocorticoides localizados no cérebro, rim e sistema vascular (reproduzido de Francischetti & Genelhu, 2006, com permissão). Uma alça adicional poderia ser acrescentada na parte esquerda da figura mostrando a influência vasoconstritora do SNS e os efeitos inotrópico e cronotrópico contribuindo para a gênese de hipertensão.



Figura 9. Resumo dos mecanismos propostos para o início do desenvolvimento de hipertensão e lesão renal na obesidade. RM indica receptores de mineralocorticoides; POMC, pró-opiomelanocortina; SRAA, sistema renina-angiotensina-aldosterona; e SNS, sistema nervoso simpático (modificado de Hall *et al.*, 2015 e reproduzido com permissão).

uma reabsorção aumentada de Na⁺ provocada por excesso de gordura visceral (Hall *et al.*, 2015) contribui, de maneira determinante, na patogênese da hipertensão associada à obesidade (Chandra *et al.*, 2014; Fantin *et al.*, 2019). Para além do rim, um estudo recente apresentou evidências de que uma ingesta alta de NaCl pode levar à obesidade induzindo a elevação de níveis endógenos de frutose (Lanaspa *et al.*, 2018), provocando ao mesmo tempo uma síndrome metabólica (Ishimoto *et al.*, 2012).

Na mesma época, foi demonstrado que a excessiva ingesta de NaCl pode levar a aumentos da pressão arterial (Weinberger, 1996; Strazzullo *et al.*, 2001), sendo considerada um dos principais fatores subjacentes à gênese da hipertensão e suas complicações cardiovasculares (Grillo *et al.*, 2019). Também, diferentes estudos em animais e humanos demonstraram que alterações nas concentrações plasmáticas de Na⁺ ([Na⁺])_{pls} contribuem para um aumento do risco de hipertensão e doenças cardiovasculares em geral (He & MacGregor, 2004; Cole *et al.*, 2019). No entanto, e também ao longo das últimas duas décadas, tem sido proposto que para além de alterações nos conteúdos de Na⁺ dos compartimentos intravascular e intersticial, o armazenamento de Na⁺ osmoticamente inativo em tecidos como a pele poderia ser crítico para o controle da pressão arterial e para a patogênese da hipertensão sensível ao sal (Titze *et al.*, 2002; Titze *et al.*, 2003; Titze *et al.*, 2006; Titze & Luft, 2017; Polychronopoulou *et al.*, 2019). E isto seria aplicável em seres obesos e magros. Este armazenamento em proteoglicanos do tecido conjuntivo, especialmente – mas não unicamente – subcutâneo, se encontra representado nas Figuras 10 e 11.

A legenda da Figura 9 descreve em detalhe quais são essas estruturas organizadas a partir de unidades de dissacarídeos que, num nível de complexidade inicial, formam glicosaminoglicanos e depois se polimerizam em proteoglicanos maiores e como os íons Na⁺ são fixados em decorrência de atrações eletrostáticas mediadas pelas cargas dos grupamentos SO₃⁻ e COO⁻. A Figura 10 apresenta as estruturas que, no leito vascular, constituem um compartimento intermediário para a distribuição do Na⁺ entre o fluído intravascular (osmoticamente ativo) e o interstício (osmoticamente inativo). A Figura 10 mostra ainda fatores que estabilizariam as atrações eletrostáticas (como a aldosterona, antagonista da aldosterona) e as que as desestabilizariam, como o estresse oxidativo e a inflamação. Esta figura mostra assim que, a partir deste compartimento intermediário, o Na⁺ poderia retornar para o fluído intravascular, expandindo-o no caso da hipertensão sensível ao sal (Titze & Luft, 2017), ou ser transferido para o interstício, incluindo a periferia dos vasos de

28

resistência em trajetórias bidirecionais que poderiam ser diferencialmente moduladas. Este ponto será retomado na apresentação dos resultados e sua discussão.

1.7. O sistema renina-angiotensina renal na gênese da hipertensão associada a alterações no transporte intrarrenal de Na⁺

Na gênese da hipertensão associada a alterações no manejo renal de Na⁺, o sistema renina-angiotensina (SRA) intrarrenal parece desempenhar um papel central (Kobori *et al.*, 2007; Navar *et al.*, 2011; Satou *et al.*, 2015). A suprarregulação do SRA¹ intrarrenal emerge como importante na gênese da hipertensão devido ao papel ativador da Ang II em transportadores renais de Na⁺ tanto luminais quanto basolaterais. Uma Ang II produzida localmente e presente no lúmen tubular em concentrações mais elevadas do que no plasma (Navar *et al.*, 2011) está em condições de ativar eficientemente, de forma autócrina e parácrina, esses transportadores via receptores AT₁ (AT₁R). Ainda, de maneira intrácrina, poderia aumentar a velocidade do transporte ativo primário de Na⁺ estimulando a produção de ATP *via* SRA intramitocondrial de túbulos proximais (Abadir *et al.*, 2011; 2012) e, consequentemente, a reabsorção do Na⁺ filtrado.

Este papel estaria principalmente associado a um desbalanço nas vias de sinalização acopladas a AT₁R e AT₂R (Gildea *et al.*, 2012; Ohsawa *et al.*, 2014; Chen & Coffman, 2015; Carey, 2017), especialmente nos processos de recrutamento e internalização desses receptores que são centrais nos processos vias de sinalização acopladas a eles (Ferrão *et al.*, 2012; Kemp *et al.*, 2014) e que modulam tanto a (Na⁺+K⁺)-ATPase basolateral (Aperia *et al.*, 1996; Kemp *et al.*, 2014) e a Na⁺-ATPase na mesma membrana (Rangel *et al.*, 2005), quanto o permutador luminal Na⁺:H⁺ (Kemp *et al.*, 2014; de Morais *et al.*, 2015). O desbalanço existente entre as vias de sinalização acopladas a que leva a uma função renal alterada, como esquematizado na Figura 9 (Hall *et al.*, 2015).

¹ Ao longo desta tese são empregadas as abreviações SRAA (para sistema renina-angiotensina aldosterona) e SRA (para sistema renina-angiotensina). A segunda é utilizada quando o envolvimento da aldosterona não existe ou não está documentado, como é o caso geral dos SRA baseados em órgãos.



Figura 10. Acumulação de Na⁺ em redes intersticiais de glicosaminoglica-nos estruturalmente organizados em proteoglicanos. A parte direita da figura mostra uma unidade de dissacarídeo modificada por processos de sulfatação (verde) ou acetilação (azul), que lhe conferem cargas negativas fixas na forma de grupos SO3ou COO⁻. Na parte central estão representados vários polímeros dessas unidades de dissacarídeo ancoradas numa proteína que os vincula, formando um glicosaminoglicano. Na parte esquerda inferior está representado um proteoglicano constituído por glicosaminoglicanos estruturados por outra proteína (representada pela linha vertical azul). Na sua parte superior está representado o glicocálix endotelial (ver figura seguinte). A natureza polianiônica da rede de glicosaminoglicanos permite interações eletrostáticas fortes com o íon Na⁺. Reproduzido de Nijst et al. (2015), com permissão.



Figura 11. Glicocálix endotelial. Esquema representativo da estrutura do glicocálix endotelial mostrando os proteoglicanos, compostos por unidades de glicosaminoglicanos (círculos azuis), vinculados entre si por proteínas (linhas azuis grossas) que os ancoram. A representação mostra os íons Na⁺ (em círculos amarelos) intercalados entre as camadas de glicosaminoglicanos que compõem o proteoglicano. A figura mostra à direita fatores que estimulam esta distribuição (em verde) ou que a desestabilizam (em vermelho). Para uma descrição detalhada ver texto. Reproduzido de Nijst *et al.* (2015), com permissão.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Investigar, em ratos jovens, uma potencial associação que uma prolongada alimentação com uma dieta hiperlipídica provocaria entre obesidade/sobrepeso com hipertensão, alterações nas ATPases renais transportadoras de Na⁺ com impacto na homeostasia corporal de Na⁺ e estabelecimento de uma síndrome metabólica, estudando ainda se estas alterações poderiam ser revertidas por Ang-(3–4), um potente antagonista fisiológico dos efeitos de Ang II.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Avaliar a evolução da massa corporal e da pressão arterial sistêmica de ratos jovens alimentados continuamente com uma dieta hipercalórica e hiperlipídica.

2.2.2. Investigar a influência da administração oral de Ang-(3–4) na pressão arterial dos ratos alimentados com a dieta hiperlipídica, quando chegarem a uma idade que corresponde a de adolescentes em humanos.

2.2.3. Investigar a magnitude da ingesta de alimento, calórica e de Na⁺ analisando efeitos de Ang-(3–4).

2.2.4. Investigar a atividade de ATPases transportadoras de Na⁺ em túbulos proximais e ramo ascendente da alça de Henle, correlacionando-as com a evolução da densidade de receptores de Ang II antes e depois da administração de Ang-(3–4) e associando-as a alterações da homeostasia corporal de Na⁺.

2.2.5. Analisar concentrações plasmáticas de Na⁺ e excreção urinária de Na⁺ antes e depois da administração de Ang-(3–4).

2.2.6. Analisar parâmetros plasmáticos (perfil lipídico, glicemia, tolerância à glicose, ácido úrico) para diagnosticar a possível instalação de uma síndrome metabólica nos ratos alimentados com a dieta hiperlipídica, associando esses perfis à evolução da pressão arterial e à homeostasia corporal de Na⁺.

3. Materiais e Métodos

3.1. Protocolo de experimentação com animais

Todos os procedimentos envolvendo tratamento de animais foram aprovados pela Comissão de Etica no Uso de Animais em Pesquisa da Universidade Federal do Rio de Janeiro (CEUA–UFRJ), com o número de protocolo 101/16 (Anexo I). Ratos Wistar machos foram criados no Biotério de Doenças Negligenciadas e Desnutrição do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ Universidade Federal do Rio de Janeiro. Após o nascimento, foram agrupados de forma que cada mãe permanecesse com 8 animais para tornar o acesso nutricional o mais homogêneo possível (Light *et al.*, 1998). Todos os machos foram preservados e, caso necessário, o numero máximo de animais foi completado com fêmeas. Após o desmame, que aconteceu no dia 21 de vida, passaram a receber uma dieta comercial padrão para roedores (Neovia) e foram agrupados, evitando efeito ninhada (Dickinson *et al.*, 2016), em gaiolas contendo no máximo 5 animais até o dia 57 de vida em um ambiente mantido a 23 \pm 2 °C constantes e em um ciclo de claro e escuro de 12 h/12 h.

No dia 58 de vida os animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos: (*i*) grupo controle (CTR), tendo acesso livre a uma ração que continha 385 kcal/100 g de ração (10% kcal provenientes de gordura); (*ii*) grupo *high lipid* (HL) que receberam uma ração hipercalórica que fornecia 574 kcal/100 g de ração com 70% destas calorias oriundas dos componentes lipídicos (Tabela 1). Tanto a ração CTR quando a ração HL foram fornecidas pela empresa PRAG Soluções. Ambos os grupos tiveram livre acesso a água filtrada durante toda a criação. Os animais foram expostos a estas dietas diferenciadas durante 106 dias e, no dia 103 (160 dias de vida), a metade destes – de cada grupo e novamente selecionados aleatoriamente – foi individualizada em gaiolas metabólicas e subdividida em outros 2 subgrupos: os que receberam e os que não receberam por gavagem 4 doses de Ang-(3–4) de 80 mg/kg de massa corporal (M) diluída em água (EZBiolab) com 12 h de intervalo, gerando assim os subgrupos adicionais CTR + Ang-(3–4) e HL + Ang-(3–4). Os ratos não tratados com Ang-(3–4) receberam um volume igual de água (Figura 12).

Tabela 1. Composição das dietas controle (CTR) e high lipid (HL)

* g/100 g de massa seca de ração; ** mequiv Na⁺/100 g de ração; *** durante duas diferentes criações

Componente*	CTR	HL
Amido de milho	46,6	5,5
Sacarose	10,0	10,0
Amido de milho dextrinizado	15,5	9,0
Sacarose em pó no <i>mix</i> de vitaminas AIN-93	1,0	1,3
Carboidratos kcal/100 g	292	103
Óleo de soja	4,0	5,1
Banha	-	39,5
Lipídeos kcal/100 g	36 (9%)	402 (70%)
Caseina	14,0	16,8
L-cystina	0,2	0,4
Proteínas kcal/100 g	57	69
Total kcal/100 g ração	385	574
Massa não nutricional (celulose)	5,0	6,3
Mix de vitaminas AIN-93	1,0	1,3
<i>Mix</i> de minerais AIN-93	3,5	5,7
Bitartrato de colina	0,3	0,3
Tert-butylhidroquinone	0,008	0,008
Conteúdo de Na ⁺ **	5,8 e 5,1***	7,7 e 8,0***



Figura 12. Desenho experimental. Linha do tempo de administração das dietas CTR e HL e de Ang-(3–4). O esquema apresenta os quatro grupos experimentais: CTR, HL, CTR + Ang-(3–4) e HL + Ang-(3–4). Na barra vertical estão indicados os dias de início da administração das dietas diferenciadas (dia 0), o dia da primeira administração de Ang-(3–4) (dia 104) e o dia de coleta de urina e sangue (dia 106).

Amostras de urina foram coletadas a cada 24 h e armazenadas a -20 °C e, após 48 h, os animais foram sacrificados por decapitação. O sangue total foi coletado em tubos contendo 2,5 mM de EDTA-Tris (concentração final), centrifugado a 13,300 × *g* para separação do plasma, armazenado imediatamente a -20 °C. O tempo em que os ratos receberam as dietas CTR ou HL foi definido com o objetivo de cobrir um período de vida que, em humanos, corresponde ao período de 10 anos entre a infância e a adolescência (Quinn, 2005). A metodologia de conversão usada para comparar idade de ratos e idade humana foi considerada apropriada para estudos de alterações no desenvolvimento de ratos obesos (Romannova, *et al.*, 2004).

3.2. Analise morfológica da gordura visceral

Após o sacrifício, as gorduras perirenal e epidídimal, consideradas marcadoras de gordura visceral (Chusyd *et al.*, 2016) foram removidas usando tesouras cirúrgicas oculares, colocadas em papel de filtro para a retirada do excesso de líquido peritoneal e sangue e posteriormente pesadas. Amostras de ~200 mg foram fixadas em uma solução contendo 4% (p/v) de paraformaldeído e depois embebidas em parafina, cortadas (4 μ m de espessura) e coradas com hematoxilina e eosina. Para obtenção das imagens foi utilizado um microscópio Eclipse E800 (Nikon) acoplado a uma câmera Evolution (Media Cybernetics). Foram fotografados ao todo 70 campos de gordura perirrenal e epididimal dos grupos CTR e HL, sendo 10 campos de cada uma das 7 amostras de tecido que foram selecionadas aleatoriamente. Foram analisadas 885 células do grupo CTR e 756 do grupo HL para medida da área de cortes transversais em μ m² por célula.

3.3. Analise de fibrose renal em ratos CTR e HL

Imediatamente após o sacrifício dos animais que receberam as dietas CTR ou HL, os rins foram cuidadosamente removidos, secados removido com papel de filtro e posteriormente pesados. Foi realizado um corte transversal na metade inferior dos órgãos utilizando um bisturi para retirar amostras de ~50 mg de tecido, imediatamente imersas em uma solução contendo 4% (p/v) de paraformaldeido, posteriormente embebidas em parafina e depois seccionadas em cortes de 4 µm de espessura. Foi utilizada a coloração Picrosirius Red para identificação de depósitos de colágeno no tecido. Para a obtenção das imagens foi também utilizado um microscópio Eclipse

E800 (Nikon), acoplado a uma câmera Evolution (Media Cybernetics). A quantificação foi realizada utilizando o software ImageJ (NHI), a partir dos pixels vermelhos numa determinada área em relação ao número total de pixels.

3.4. Medida da pressão arterial sistólica

A pressão arterial sistólica (PAS) foi registrada semanalmente através de pletismografia de cauda, utilizando o pletismógrafo V3.0 (Insight). Os animais foram colocados em contensores, sem utilização de anestésico e deixados em um período de aclimatação de 10 min em temperatura de 30–32 °C. Três medidas foram obtidas com aproximadamente 5 min de intervalo sendo utilizada como valor para analise a média destas medidas. Os animais que foram individualizados em gaiolas metabólicas permaneceram em um período de aclimatação de ~5 h, e a primeira medida de PAS foi realizada 24 antes de receberem a primeira dose de Ang-(3–4), e depois a cada 12 h, também imediatamente antes de receberem o peptídeo (ou agua). As figuras apresentam os valores obtidos antes da primeira dose de e 12 h após a última.

3.5. Determinação do conteúdo de Na⁺ na ração e de sua concentração nas amostras de plasma e urina

As determinações de Na⁺ foram realizadas empregando fotometria de chama (Analyser). Para as determinações de Na⁺ nas rações (CTR e HL) foram retiradas 3 amostras de 0,5 g, maceradas, colocadas em tubos Pyrex, e secas em estufa a 200 °C durante 4 h. Após transcorrido o tempo de secagem foram adicionados 5 ml de HNO₃ 1 M, com posterior agitação constante por 48 h a temperatura ambiente, seguida de centrifugação em centrífuga clínica durante 10 min, para coletar e o sobrenadante. A partir do conteúdo de Na⁺ (mequiv Na⁺/100 g de ração) foi possível calcular a ingesta diária de Na⁺ (mequiv Na⁺ em 24 h/100 g de MC a partir do consumo de alimento dos animais albergados nas gaiolas metabólicas.

As amostras de urina destes mesmos animais foram coletadas em intervalos de 24 h. A primeira amostra foi coletada antes de administração de Ang-(3–4) no dia 104 de dieta e a última no dia 106, imediatamente antes do sacrifício. As amostras foram armazenadas a -20 °C. A partir destas determinações e o volume urinário mensurado em 24 h foi possível calcular a excreção urinária de Na⁺ em 24 h (U_{Na}V). As amostras de sangue total obtidas após o sacrifício foram coletadas em tubos

37

contendo 2,5 mM de EDTA-Tris (concentração final) centrifugadas a 17.000 × g por 5 min para obter as amostras de plasma, armazenadas a -20 °C.

3.6. Glicemia no jejum e investigação da tolerância à glicose

Aos 95 dias de dieta (153 dias de vida), parte dos animais que receberam dieta CTR ou HL foram mantidos em jejum por 10 h (água *ad libitum*) para medida da glicemia. Imediatamente depois receberam por gavagem 2 g de glicose/kg MC. A medida da glicemia foi realizada utilizando o glicômetro *one touch-ultra mini*, tomando como ponto inicial para a construção da curva (tempo zero) o valor da glicemia no jejum. As medidas seguintes foram feitas com 15, 30, 50, 60 e 120 min de intervalo.

3.7. Isolamento das frações de membrana de túbulos proximais e de medula externa renal

Após o sacrifício, os rins foram imediatamente retirados para obtenção de frações enriquecidas de membranas de células de túbulos proximais e de medula externa renal, seguindo os procedimentos previamente descritos (Vieyra et al., 1986), com pequenas modificações. Os rins foram colocados em uma solução gelada contendo sacarose 250 mM, Hepes-Tris 10 mM (pH 7,4), EDTA 2 mM, PMSF 1 mM e 0,15 mg/ml de inibidor de tripsina tipo II-S (T1021; Sigma-Aldrich). Foram inicialmente cortados com bisturi para obter cortes longitudinais a partir dos quais foram obtidas secções finas de aproximadamente 0,5 mm utilizando um micrótomo Stadie-Riggs (Thomas Scientific). A partir destes cortes foram isolados o cortex corticis, região mais externa do tecido renal na qual mais de 90% da população de células corresponde à de túbulos proximais (Whittembury & Proverbio, 1970), e a medula externa, regiões facilmente identificáveis macroscopicamente. Obtidos estes fragmentos, eles foram homogeneizados separadamente após de suspensos na solução acima (4 ml: 1 g de tecido) a 4 °C, utilizando um homogeneizador (Potter-Elvejhem) na velocidade de 1.700 rpm durante 1 min, operação repetida cinco vezes com intervalos de 1 min. A amostra obtida foi centrifugada a 1.000 \times g por 15 min a 4 °C (rotor JA-20, Beckman) para remoção de células não rompidas, núcleos e pequenos fragmentos de tecido não homogeneizado. O sobrenadante foi centrifugado a 15.000 × g por 20 min a 4 °C (rotor JA-20, Beckman) para remoção das mitocôndrias. O sobrenadante recuperado foi coletado e centrifugado a $35.000 \times g$ a 4 °C (rotor 70 Ti, Beckman). O sedimento obtido

foi ressuspendido em 250 mM de sacarose. A concentração de proteína foi determinada através do método colorimétrico que emprega o reagente de Folin (Lowry *et al.*, 1951).

3.8. Determinação da atividade da (Na⁺+K⁺)-ATPase sensível a ouabaína e da Na⁺-ATPase resistente à ouabaína e sensível a furosemida

A atividade das duas proteínas transportadoras de Na⁺ foi mensurada através da quantificação da liberação de fosfato (P_i) pelo ATP (Taussky & Shorr, 1953). Para os ensaios de atividade da (Na⁺+K⁺)-ATPase, amostras enriquecidas de membrana plasmática obtidas a partir de cortex corticis ou de medula externa (0,05 mg/ml) foram pré-incubadas a 37 °C por 10 min em Bis-Tris propano 50 mM (pH 7.4), EDTA 0,2 mM e MgCl₂ 5 mM, na ausência ou na presença de ouabaína 2 mM. A reação foi iniciada (a 37 °C) adicionando 5 mM de ATP e 24 mM de KCl (concentrações finais) e interrompida 10 min depois adicionando 1 volume de carvão ativado em 1 N HCl. O ensaio colorimétrico foi realizado empregando o sobrenadante obtido após centrifugação (13.000 × *g* por 10 min) para remover o carvão. A atividade da (Na⁺+K⁺)-ATPase foi calculada a partir da atividade total e daquela obtida na presença de ouabaína.

No ensaio de atividade da Na⁺-ATPase resistente à ouabaína, as amostras de membrana (0,2 mg/ml) foram pré-incubadas a 37 °C por 10 min em uma solução contendo Hepes-Tris 20 mM (pH 7,0), MgCl₂ 10 mM, NaCl 120 mM e ouabaína 2 mM, na presença ou ausência de furosemida 2 mM. A reação (a 37 °C) foi iniciada com a adição de 5 mM ATP (concentração final) e finalizada após 10 min seguindo o mesmo processo descrito acima para a (Na⁺+K⁺)-ATPase. A atividade da Na⁺-ATPase resistente a ouabaína, sensível a furosemida, foi calculada pela diferença entre os valores de atividade obtidos na presença e na ausência de furosemida.

3.9. SDS-PAGE e Western blotting

Receptores de angiotensina II do tipo 1 (AT₁R) e do tipo 2 (AT₂R) foram identificados por imunodetecção em amostras de frações de membrana células de túbulos proximais, como descrito previamente (Silva *et al.*, 2014a,b). A especificidade

dos anticorpos foi verificada através de experimentos de imunoadsorção empregando os antígenos a partir dos quais foram obtidos (Silva *et al.*, 2014a). As duas classes de receptores foram detectadas pelo seus específicos anticorpos em diluições de 1:1.500 (monoclonal sc-57036 para AT₁R, policlonal sc-9040 para AT₂R; Santa Cruz Biotechnology), após a separação das proteínas por peso molecular em um gel de eletroforese contendo 15% de poliacrilamida e SDS (Laemmli, 1970) e de sua transferência para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare). As membranas foram incubadas por 1 h em solução contendo 5% (p/v) de leite desnatado (Molico) diluído em TBS (Tris Buffer Saline) pH 7,6. Os anticorpos secundários foram antimouse NA931(GE Healthcare) e antirabbit NA934 (GE Healthcare). O controle de carregamento foi obtido pela imunodetecção de β -actin (monoclonal A5441; Sigma-Aldrich). Para a detecção do sinal de imunofluorescência das proteínas alvo foi utilizado o equipamento LAS 4000 system (GE Healthcare). As intensidades das marcações foram quantificadas utilizando o *software* imageJ (NHI).

3.10. Estudo do perfil lipídico plasmático

Após 70 de dieta (128 dias de vida) os animais que receberam as dietas CTR e HL foram deixados em jejum de 10 h (água *ad libitum*), anestesiados após este período utilizando éter etílico para a coleta de sangue por punção caudal. O sangue foi imediatamente centrifugado a $13.000 \times g$ por 5 min e o plasma foi coletado para dosagem de colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos utilizando kits comerciais (colesterol total monoreagente, Bioclin K083; colesterol HDL enzimático, Bioclin K015; triglicérides monoreagente, Bioclin K117). Para estimar o colesterol LDL foi utilizada a equação empírica de Friedewald (Friedewald *et al.* 1972): LDL = CT-HDL-TG/5, onde LDL significa *low-density lipoprotein*, CT corresponde a colesterol total, HDL à *highdensity lipoprotein* e TG a triglicerídeos.

3.11. Medida do ácido úrico plasmático

As determinações de acido úrico foram realizadas utilizando o plasma coletado dos animais que receberam dieta CTR ou HL durante 106 dias, com ou sem Ang-(3–4) e um kit comercial (ácido úrico monoreagente, Bioclin K139).

3.12. Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando o *software* GraphPad Prism 6.0.1. Para comparação entre duas médias foi utilizado o teste *t* de *student* pareado ou não pareado, conforme indicado nas legendas das figuras. Quando as comparações foram feitas entre mais de três médias foi utilizada ANOVA-1 fator, seguido do teste de Bonferroni para pares selecionados (indicados nas figuras). Correlações entre variáveis associadas por uma função linear foram analisadas por mínimos quadrados e as diferenças entre inclinações de funções correspondentes a grupos diferentes foram feitas analisadas a partir de múltiplas comparações. As diferenças foram consideradas significativas a partir de um valor de P < 0,05. Os valores de Pencontram-se indicados nas figuras, nas legendas ou no texto.

4. Resultados e Discussão

4.1. A administração de dieta hiperlipídica induz sobrepeso com significativo aumento da gordura visceral em ratos jovens

As observações iniciais (Figura 13A) demonstraram que, uma semana depois de uma exposição a uma dieta na qual 70% do conteúdo calórico total (574 kcal/100 g de dieta) é proveniente de lipídeos (*i.e.* ~402 kcal/100 g) (dieta HL)², ratos jovens apresentaram uma massa corporal (BM) estatisticamente maior que os animais da mesma idade que receberam uma dieta industrializada para roedores preparada conforme as recomendações da AIN-93 (dieta controle, CTR) (Reeves, 1997) na qual apenas 36 kcal/100 g de dieta eram provenientes de lipídeos (Tabela 1). Os conteúdos de Na⁺ das dietas durante duas criações foram 5,8 e 5,1 mequiv/100 g (dieta CTR) e 7,7 e 8,0 meguiv/100 g (dieta HL), respectivamente, ou seja, 34% e 73% mais altas na dieta HL nas duas criações comparadas. A análise destas diferenças será retomada ao apresentar os resultados das Figuras 20 e 22. As constantes de velocidade de crescimento k obtidas guando uma função exponencial que tende a um máximo foi ajustada aos pontos experimentais (descrita na legenda da Figura 13A) foram de 0,0164 e 0,0147 dias⁻¹, para os grupos CTR e HL, respectivamente. E, portanto, similares valores para o $t_{1/2}$ requerido para alcançar uma mais alta BM_{max} num tempo $t_{\rightarrow\infty}$, são indicativas de uma progressiva acumulação mais alta de gordura. Depois de 106 dias de dieta, os valores de BM experimental nos ratos HL alcançaram 498 \pm 11 g, em contraste com os 427 \pm 7 g para os ratos CTR (Figura 13B)

A hipótese inicial de importante acumulação de gordura visceral – apesar do modesto, porém significativo aumento de 17% na BM ao final do estudo foi confirmada pelos resultados apresentados na Figura 14. A gordura em torno do epidídimo que, como já mencionado é considerada um marcador de gordura visceral (Chusyd *et al.*, 2016) aumentou em mais de 60% e a perirrenal em 50%. O aumento total do tecido adiposo perirrenal e epididimal se acompanhou de aumento do tamanho dos adipócitos como o demonstrado

² Na tese serão preservadas as abreviações, bem como as legendas das abscissas e ordenadas das figuras em língua inglesa, tais como apresentadas no trabalho em anexo.



Figura 13. Ratos alimentados com a dieta HL desenvolvem massa corporal maior que os ratos alimentados com a dieta CTR. (A) Evolução da massa corporal. Ratos machos com 58 dias de vida (tempo 0) receberam dieta CTR (círculos) ou HL (triângulos) durante 106 dias, como indicado na abscissa. A massa corporal foi registrada semanalmente (pontos ao longo da curva, média ± erro padrão, n = 40 em cada grupo). * indica diferença entre grupos da mesma idade, avaliado com ANOVA-1 fator seguido do teste de Bonferroni para os pares CTR e HL da mesma idade. P variou de 0.047 no dia 7 de exposição à dieta HL a <0.0001 a partir do 21º dia. A função exponencial de crescimento $BM_t = BM_{58} + BM_{\infty} \times (1 - e^{-kt})$ foi ajustada à média dos pontos experimentais. BMt: massa corporal no tempo t; BM₅₈: massa corporal no dia 58 de vida; BM_o: valor assintótico da massa corporal depois de 106 dias de exposição às dietas diferenciadas (i.e. valor máximo teórico de massa corporal adicional entre os dias 58 e 164 de vida); k: constante de velocidade de crescimento em dias⁻¹; t: tempo. (B): Massa corporal dos ratos dos grupos CTR e HL (como indicado na abscissa) após 106 dias de exposição às dietas. A diferença indicada sobre as barras (média \pm erro padrão, n = 40 em cada grupo) foi avaliada por teste t de Student não pareado.

nas imagens microscópicas apresentadas nas Figura 15A,B,E,F e cujas seções de corte médias estão quantificadas nas Figura 15C,G. Os aumentos da média das seções microscópicas de corte, de ~100% para a gordura epididimal e de ~50% na perirrenal indica aumento de tamanho adipocitário, confirmado quando se analisa a distribuição das áreas seccionais de corte. Pode ser observado (Figura 15D,H) um deslocamento para adipócitos maiores no grupo HL: estes predominam nos intervalos >3.000 μ m², enquanto os provenientes de ratos CTR estão majoritariamente distribuídos nos intervalos entre 1.000 e 3.000 μ m².

Estes aumentos de gordura visceral com anormalidades na função dos adipócitos, como proposto nas Figuras 7 e 8 levariam a uma exacerbação do e do SRAA circulante e do SRA local e a uma liberação também cada vez mais intensa de citocinas pró-inflamatórias, com um estímulo anormal do transporte renal de Na⁺ que resulta numa reabsorção aumentada (Francischetti & Genelhu, 2006; Hall et al., 2015). A acumulação aumentada de tecido adiposo perirrenal, especialmente no compartimento perivascular conhecido como sinus renal, tem sido associada com formas severas de hipertensão uma década atrás (Chughtai et al., 2010) embora as causas, provavelmente várias e interligadas (Hall et al., 2019), não estejam totalmente caracterizadas, especialmente no seu componente inflamatório (West-Eberhard, 2019). Aos fatores mecânicos de compressão que elevariam a pressão hidrostática intrarrenal alterando a resposta pressão-natriurese (Guyton et al., 1972) e ativando tanto o SRAA quanto o SRA intrarrenal (De Pergola et al., 2015) se somariam a ativação do SNS, ativação de receptores de mineralocorticoides, processos todos capazes de levar a um aumento da reabsorção de Na⁺ em diferentes segmentos do néfron. Especial atenção passou a merecer, há mais de 15 anos, o estímulo da liberação de citocinas (Lee et al., 2006; Granger et al., 2006), como acima mencionado, o que somado a uma suprarregulação do SRAA e do RAS local, também contribuiria para uma exacerbação do SNS ao nível tecido renal, e também no sistema nervoso central (SNC) e na vasculatura periférica (Alexander et al., 2002; LaMarca et al., 2005; DeMarco et al., 2010).

Os seguintes experimentos destinaram-se a responder a seguinte pergunta, já delineada na hipótese de trabalho: os ratos jovens expostos durante pouco mais de 100 dias a uma dieta HL, com sobrepeso moderado mas com importante acúmulo de tecido adiposo visceral se tornaram hipertensos?



Figura 14. Aumento da gordura epididimal e perirenal em ratos jovens com sobrepeso alimentados com a dieta HL. (A e B): Massa total de gordura em torno do epidídimo e dos rins, respectivamente, após 106 dias de exposição às dietas CTR (n = 45 pares de epidídimos, n = 7 pares de rins) ou HL (n = 46 pares de epidídimos, n = 8 pares de rins), como indicado nas abscissas. As diferenças (valores de *P* dentro dos painéis) foram analisadas empregando o teste de *t* de Student não pareado.

barra mostra os valores correspondentes a ratos CTR (parte vazia das colunas) e HL (parte vazia) em cada intervalo de área gordura epididimal e perirenal (% do total de células com áreas de cortes seccionais nos intervalos mostrados nas abscissas). Cada analisadas empregando o teste de t de Student não pareado. (D e H): Distribuição de áreas de cortes seccionais de adipócitos de gráfica da área de adipócitos (área de corte seccional por célula) de epidídimos e gordura perirenal, de ratos CTR e HL, como como mostrado na parte superior das imagens à esquerda, após 106 dias de exposição às respectivas dietas. (C e G): Representação representativas – coloração de hematoxilina eosina – de adipócitos epididimais (A e B) e perirrenais (E e F) em ratos CTR e HL Figura 15. Aumento do tamanho celular em adipócitos da gordura epididimal e perirenal dos ratos com sobrepeso. Imagens indicado nas abscissas. As barras representam médias ± erro padrão. As diferenças (valores de P dentro dos painéis) foram



4.2. A dieta hiperlipídica levou a um quadro hipertensivo sensível à Ang-(3–4)

A Figura 16 apresenta a evolução da pressão arterial sistólica (PAS) dos dois grupos de ratos durante o período de 106 dias em que estiveram submetidos às dietas diferenciadas. A PAS dos animais CTR permaneceu oscilando em torno dos 130 mmHg durante todo o estudo, enquanto a dos ratos que desenvolveram sobrepeso aumentou progressivamente, se tornando estatisticamente mais alta depois de 60 dias de exposição à dieta HL. Esta PAS moderadamente alta, em torno de 140 mmHg, se manteve aproximadamente constante até o final do estudo.

A Figura 17 mostra que a administração de quatro doses orais (de 80 mg/kg MC) de Ang-(3–4) (Val-Tyr): (i) teve um efeito hipotensor muito pequeno em ratos CTR (131 \pm 1,01 mmHg antes da administração e 128 \pm 1,14 mmHg 48 h depois) (Figura 17A), (ii) mas diminuiu os valores de PAS dos ratos HL para os mesmos níveis médios encontrados nos animais CTR (Figura 17B). A hipertensão dos ratos HL e o contraste de efeitos quando se administrou Ang-(3–4) podem ser mais bem apreciados, de maneira conjunta, na Figura 17C. Em síntese, poderia ser discutido inicialmente como os ratos jovens com ligeiro sobrepeso se tornaram hipertensos, num quadro totalmente revertido pelo mais curto peptídeo derivado de angiotensinas, a Ang-(3–4) (Saito *et al.*, 1994; Matsufuji *et al.*, 1995; Kawasaki *et al.*, 2000; Axelband *et al.*, 2009a,b; Axelband *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2014; Dias *et al.*, 2017).

Como a Ang-(3–4), é um potente antagonista dos efeitos da Ang II em diferentes processos e sistemas (Dias *et al.*, 2017) pode ser inicialmente postulado, como discutido no ponto anterior, que os ratos alimentados com a dieta HL tiveram suprarregulados – de maneira progressiva, como o sugere a evolução dos valores pressóricos – seu SRAA e seu SRA intrarrenal. Uma

hipótese que poderia ser complementada propondo que eles passaram a ter uma reabsorção aumentada de Na⁺ em diferentes segmentos do néfron. Rele vante, em relação a esta proposta, é o efeito neutralizador da inibição por Ang II do transporte ativo de Ca²⁺ mediado pela Ca²⁺-ATPase de túbulos proximais (Axelband *et al.*, 2009a,b). Os mecanismos moleculares deste efeito neutralizador envolvem dissociação de heterodímeros, com diminuição da atividade da PKC e o estímulo



Figura 16. Ratos com sobrepeso alimentados com a dieta HL desenvolvem hipertensão arterial. Evolução da pressão arterial sistólica (PAS) de ratos alimentados com dieta CTR (círculos vazios) e HL (triângulos vazios). Os pontos mostram médias \pm erro padrão (n = 40 em cada grupo). * indica diferenças entre grupos CTR e HL da mesma idade a partir do 63º dia de exposição às diferentes dietas (*P*<0,001 em todos os casos). As diferenças foram avaliadas empregando ANOVA-1 fator seguido de teste de Bonferroni para pares selecionados, que foram os CTR e HL de cada idade.



Figura 17. A administração de Ang-(3–4) diminui a pressão arterial sistólica de ratos com sobrepeso para valores encontrados em ratos controle. (A e B): Ratos submetidos a dietas HL (n = 20) e CTR (n = 22), respectivamente, durante 106 dias, antes e depois de receber quatro doses de Ang-(3–4) a partir do dia 104 de dieta, como indicado nas abscissas. Note que, em cada grupo, há uma acentuada superposição de valores e, portanto, de símbolos. As diferenças (valores de *P* dentro dos painéis) foram avaliadas empregando teste de *t* de Student pareado. As caixas vermelhas mostram os valores de PAS (médias \pm erro padrão) antes e depois da administração de Ang-(3–4). (C): Comparação dos valores de PAS de ratos alimentados com dietas CTR ou HL que receberam ou não Ang-(3–4), conforme indicado na abscissa. As diferenças (valores de *P* para cada comparação estão indicados dentro do painel) foram avaliadas empregando ANOVA-1 fator seguido do teste de Bonferroni para pares selecionados.

simultâneo da via de cAMP/PKA (Axelband *et al.*, 2009a,b; Axelband *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2014). Oscilações de Ca²⁺, bem como as atividades de PKC e PKA são centrais nos processos que estimulam a reabsorção em túbulos proximais (Du *et al.*, 2003; Ferrão *et al.*, 2012), devido à modulação de fosforilações de transportadores de Na⁺ acoplados a vias de sinalização que se iniciam em AT₁R (Aperia *et al.*, 1994). A este conjunto de observações que dão suporte à ideia de que, ao menos em parte, os efeitos anti-hipertensivos da Ang-(3–4) mostrados na Figura 16 podem ser atribuídos a uma diminuição da reabsorção de Na⁺ por infrarregular a via de sinalização acoplada a AT₁R, se soma a de que Ang-(3–4) inibe a Na⁺-ATPase resistente à ouabaína em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e estimula a excreção urinária de Na⁺ diminuindo a relação PKC/PKA (Dias *et al.*, 2014).

Para além de efeitos anti-hipertensivos devidos a uma diminuição da reabsorção de Na⁺ através do epitélio tubular renal, possivelmente como resultado de um antagonismo *via* AT₂R com aqueles mediados por Ang II/AT₁R ao nível local (Navar *et al.*, 2011) – cuja discussão será retomada mais abaixo – é preciso descrever possíveis efeitos exercidos sobre o SRAA ao nível vascular. Um dos primeiros é a diminuição da atividade da enzima conversora de angiotensina (ACE) demonstrado 25 anos atrás (Saito *et al.*, 1994; Matsufuji *et al.*, 1995), um efeito que leva à diminuição dos níveis de Ang II circulante, com diminuição da resistência vascular periférica, além de também influenciar a reabsorção distal de Na⁺ como resultado de uma diminuição dos níveis de aldosterona circulante. Este efeito foi comprovado quando se demonstrou uma diminuição da pressão arterial diastólica (PAD) após a administração endovenosa de Ang-(3–4) (Matsufuji *et al.*, 1995).

Todavia, os efeitos anti-hipertensivos em ratos com sobrepeso mostrados na Figura 16 foram os de normalização da PAS, o que já havia demonstrado por Dias *et al.* (2014). Estes efeitos podem ser explicados com base no efeito vasodilatador exercido em grandes vasos como a aorta torácica e as artérias mesentéricas. A Ang-(3–4) é capaz de relaxar anéis de aorta contraídos pela incubação na presença de altas concentrações de KCI (Tanaka *et al.*, 2006) e se acumula *in vivo* nas artérias mesentéricas quando administrada oralmente (Matsui *et al.*, 2004). Por ser proposta a hipótese de que no sobrepeso e na obesidade há um componente importante da complacência vascular dos grandes vasos no qual uma diminuição da distensibilidade da aorta (AD) torácica e abdominal (*i.e.* aumento da rigidez) contribui para o aumento da PAS, como mostrado em SHR (Resnick *et al.*, 1997), cuja PAS é diminuída pela Ang-(3–4) (Dias *et al.*, 2014).

Retomando o ponto de uma possível suprarregulação do SRA intrarrenal em ratos com sobrepeso alimentados com uma dieta HL e de um desbalanço entre AT₁R e AT₂R, a Figura 18 mostra que esse é o caso. O pronunciado aumento (~85%) na abundância de AT₁R em membranas de túbulos proximais (Figuras 18 A, C), que coexiste com uma acentuada diminuição (~70%) de AT₂R (Figuras 18B, D), confere suporte à hipótese de que o desbalanço entre essas duas classes de receptores provocado por sinais gerados a partir da gordura perirrenal acumulada em excesso suprarregulando o SRA local (Figuras 14 e 15) – constituiria um dos elementos de relevância para o estímulo da reabsorção proximal de Na⁺. De maneira interessante, a administração de Ang-(3-4) restabeleceu a densidade de AT₁R em ratos HL para os níveis encontrados em ratos CTR, sem qualquer efeito nestes últimos, um efeito semelhante ao encontrado na PAS na Figura 16. Isto sugere que a administração de Ang-(3-4) promoveu a internalização destes receptores em túbulos proximais via megalina direcionando-os para a via de degradação endocítica (Vegt et al., 2011) e, assim restabelecendo para níveis CTR uma reabsorção de transepitelial de Na⁺ possivelmente aumentada.

Não houve efeito significativo de Ang-(3–4) sobre a abundância de AT₂R, indicando que não foi exercido qualquer efeito ao nível da síntese de sua proteína, permanecendo em aberto a questão de uma falta de influência ao nível nuclear. Isto porque a ocorrência de reciclagem de receptores de Ang II entre a membrana plasmática e organelas – incluindo o núcleo – é um fenômeno bem estabelecido em SRAs baseados em órgãos (Merjan *et al.*, 2001). E apesar de não existir aumento da densidade de AT₂R a sinalização a partir deles pode estar suprarregulada pela Ang-(3–4), uma vez que ela atua como um "ativador alostérico" dos efeitos contrabalanceadores, que a Ang II e-xerce através de AT₂R, sobre aqueles mediados *via* AT₁R: ela aumenta a afinidade de AT₂R por Ang II na faixa subnanomolar de concentrações em células de linhagem renal que superexpressam esta classe de receptores (Axelband *et al.*, 2012). As próximas subseções estarão destinadas a apresentar os resultados da investigação dos efeitos de Ang-(3–4) na homeostasia corporal de Na⁺, incluindo aqueles exercidos nos transportadores ativos primários de Na⁺ em túbulos contornados proximais e alça de Henle.



Figura 18. Suprarregulação de receptores AT_1 e infrarregulação de receptores AT_2 para Ang II ($AT_1R e AT_2R$, respectivamente) em túbulos renais de ratos com sobrepeso (A e B): Imunodetecções representativas de $AT_1R e AT_2R$, respectivamente, em membrana plasmática de túbulos proximais de ratos CTR e HL que receberam ou não Ang-(3–4). O grupo experimental (CTR, HL, CTR + Ang-(3–4), HL + Ang-(3–4)) encontra-se indicado na parte superior de cada *lane*. Cada painel apresenta imunodetecções de dois experimentos diferentes (quatro *lanes* para cada um) no mesmo gel, que foram realizados utilizando diferentes preparações de membranas tubulares. As bandas de géis inferiores correspondem ao controle de carregamento (β -actina). (**C** e **D**): Representação da quantificação das imunodetecções de AT₁R e AT₂R (n = 6 e n = 4 preparações diferentes, respectivamente) nas membranas dos túbulos proximais dos quatro grupos, como indicado nas abscissas. As barras correspondem a médias ± erro padrão de unidades arbitrárias das densitometrias corrigidas pelo carregamento, nas combinações de dietas e tratamento ou não com Ang-(3–4) indicadas nas ordenadas. As diferenças foram analisadas empregando ANOVA 1-fator seguido do teste de Bonferroni para pares selecionados. Os valores de *P* estão indicados nos painéis.

4.3. Ang-(3–4) diminui a ingesta de alimento, de energia e de Na⁺ em ratos com sobrepeso, mas não em ratos CTR

Os ratos que desenvolveram sobrepeso como resultado da exposição à dieta HL durante 106 dias consumiram menos alimento que os CTR (Figura 19A), possivelmente como resultado de um mecanismo regulatório ativado para manter a ingesta calórica ao nível do controle (como visto na Figura 19B) e assim diminuir a acumulação corporal de gordura. Retornando à ideia apresentada e desenvolvida acima na seção **1.4**, esta diminuição poderia ser devida a modulação, a partir da gordura visceral – mesmo na presença provável de altas concentrações de leptina circulante – da atividade de neurônios hipotalâmicos que produzem POMC e que regulam o balanço energético corporal (de Araujo & Velloso, 2020), especialmente no caso de uma alimentação rica em gordura (de Araujo *et al.*, 2018). O envolvimento do SRAA nesta modulação negativa também deve ser considerado, uma vez que suas ações dentro do tecido adiposo e no SNC parecem ser opostas (Bruce & de Kloet, 2017).

A administração de Ang-(3–4), que não teve efeito em ratos CTR diminuiu a ingesta de alimento (Figura 19A) e, consequentemente, a calórica, dos ratos HL (Figura 19B), indicando a existência de um efeito no SNC que poderia ser exercido ao nível das diferentes conexões que controlam o balanço de energia e que são reguladas pelo SRAA e, possivelmente pelo SRA local, com participação de AT₂R (Ohinata *et al.*, 2008). Pode ser então proposto que efeitos da Ang-(3–4) ao nível destes receptores assentariam no mesmo mecanismo de aumento da sua afinidade por Ang II como demonstrado para células renais (Axelband *et al.*, 2012). Outros peptídeos menores derivados de angiotensinas, como é o caso da Ang-(1–7), são capazes de reduzir o apetite através da modulação de efeitos centrais da insulina (Cao *et al.*, 2014). Como será apresentado e discutido em seguida, a influência de um efeito preponderante de Ang-(3–4) no apetite de Na⁺ – conjuntamente com outros sobre a ingesta de alimento – deve ser considerada.

A Figura 20 apresenta evidências das alterações que a dieta HL provoca no balanço de Na⁺ corporal e, especialmente, dos pronunciados efeitos exercidos pela Ang-(3–4), novamente sem efeito – ou com um efeito muito pequeno – em ratos CTR.



Figura 19. A Ang-(3–4) provoca uma diminuição na ingesta de dieta e de energia em ratos com sobrepeso alimentados com a dieta HL, mas não em ratos controle. (A e B): Ingesta de ração e de energia, respectivamente, entre os dias 104 e 106 de exposição às dietas diferenciadas sem e com administração de Ang-(3–4), como indicado nas abscissas. As barras correspondem a médias \pm erro padrão. As diferenças foram avaliadas empregando ANOVA-1 fator seguido do teste de Bonferroni para pares selecionados. Valores de *P* indicados dentro de cada painel; n = 10 (CTR), n = 9 (HL), n = 10 (CTR + Ang-(3–4)), n = 11 (HL + Ang-(3–4)).

Deve ser mencionado novamente que os resultados correspondem a duas criações em períodos diferentes, sendo que o conteúdo de Na⁺ da dieta HL foi 33% e 57% mais alto na primeira e na segunda, respectivamente. A razão de utilizar um conteúdo mais alto na ração HL foi para acentuar a sinergia de alta gordura e alto Na⁺ na gênese de hipertensão, como apresentado na subseção **1.5** da Introdução. A razão para o emprego de dois conteúdos altos, sendo um a metade do outro, foi para testar a hipótese de que os animais HL ajustariam sua ingesta alimentar para manter a de Na⁺ em níveis do CTR.

A Figura 20 mostra que a ingesta de Na⁺ nos grupos CTR e HL, considerando as duas criações em conjunto, foi semelhante, dando suporte à ideia de que os segundos ajustariam sua ingesta alimentar com uma ração contendo um conteúdo de Na⁺ diferente para a ingesta de sal fosse mantida em valores semelhantes. O mesmo painel mostra o acentuado decréscimo (~60%) da ingesta de Na⁺ nos ratos HL que receberam Ang-(3-4), sem efeito no grupo CTR. Surge então a pergunta: como poderia estar atuando a Ang-(3-4) naqueles ratos que foram alimentados com a dieta HL? Há mais de 40 anos surgiram as primeiras evidências acerca do importante papel do SRAA como importante regulador do apetite de Na⁺ (Fitszimons & Wirth, 1978; Bryant et al., 1980; Fluharty & Epstein, 1983) e evidências posteriores permitiram dar realce ao SRA local residente em diferentes regiões do SNC (Sakai et al., 1990; Fitszimons, 1998). Mais recentemente, um estudo (Gasparini et al., 2019) confirmou a importância da Ang II no SNC estimulando o apetite de Na⁺ e aumentando a pressão arterial sistêmica através de mecanismos exercidos na parte anterior do cérebro, demonstrando que o papel sinérgico da aldosterona seria exercido sensitizando mecanismos pressores na parte posterior do mesmo cérebro.

Os efeitos inicialmente descritos acerca do papel estimulatório da Ang II injetada intracerebralmente não foram observados em ratos alimentados com uma dieta controle para roedores ou adrenalectomizados (Fitszimons & Wirth, 1978; Sakai *et al.*, 1990), de modo que a ingesta "normal" de Na⁺ em ratos HL poderia ser resultado da coexistência de um SRA suprarregulado no SNC (Winkler *et al.*, 2016) potenciado por um efeito permissivo ou potenciador da aldosterona aumentada (Francischetti & Genelhu, 2006) – como em diferentes tecidos na obesidade – controlado por inibidores do apetite em resposta a um incremento dos níveis tissulares de Na⁺ dentro do próprio SNC, como eferências de neurônios que expressam o receptor 2c para serotonina (Htr2c), encontrados no núcleo parabraquial lateral (LPBM^{Htr2c}) (Park *et al.*, 2020).



Figura 20. A administração de Ang-(3–4) diminui a ingesta de Na⁺ em 24 h em ratos com sobrepeso que receberam a dieta HL, sem efeito em ratos controle. Ingestão de Na⁺ em 24 h em ratos dos grupos CTR e HL depois de 106 dias, que receberam ou não Ang-(3–4) como indicado na abscissa. As barras correspondem a médias \pm erro padrão. As diferenças foram analisadas utilizando ANOVA-1 fator seguido do teste de Bonferroni para pares selecionados. Valores de *P* indicados dentro da figura; n = 10 (CTR), n = 10 (HL), n = 11 (CTR + Ang-(3–4) e HL + Ang-(3–4)). Pode ser proposto que, assim como em outros tecidos (Dias *et al.*, 2014), a Ang-(3–4) atuaria nesse "microambiente pró-hipertensivo" antagonizando os efeitos da Ang II e, na presença de estímulos locais supressores do apetite de Na⁺, levar ao acentuado decréscimo da ingesta de Na⁺. Este antagonismo resultaria numa diminuição do hedônico valor que a Ang II proporcionaria ao sal, como proposto no clássico trabalho de Bryant *et al.* (1980) já mencionado e, consequentemente, do apetite de Na⁺.

A Figura 21 apresenta, de maneira combinada, os resultados das Figuras 19 e 20, permitindo a visualização das relações entre ingesta de alimento, ingesta calórica e ingesta de Na⁺ nos quatro grupos experimentais: CTR; HL; CTR+Ang-(3-4); HL+Ang-(3-4), destacando os efeitos da Ang-(3-4) nos ratos com sobrepeso. As correlações efetuadas e como os dados foram analisados e agrupados se encontram detalhados na legenda figura, de modo que neste texto os apresentaremos resumidamente com as conclusões que deles emergem. A Figura 21A apresenta duas funções e, para além da conclusão óbvia de que os ratos HL ingerem menos alimento para manter os níveis de calorias consumidas nos níveis dos ratos CTR, como já evidenciado na Figura 19B, no seu requadro (1) ela mostra que a maioria dos ratos com sobrepeso que receberam Ang-(3-4) (8/11) (vermelho) tiveram a menos ingesta calórica dentro de linhas de corte arbitrariamente fixadas em 1 g de alimento em 24 h/100 g BM e 5,5 kcal em 24 h/100 g BM. Os demais ratos HL se situaram acima destas linhas de corte (em 2), evidenciando com clareza a existência de duas populações de ratos HL que tiveram diferente ingesta energética: a dos que não receberam (azul) e a dos que receberam Ang-(3-4) (vermelho). A segunda função indica que os ratos submetidos à dieta CTR tiveram que ingerir mais alimentos para conseguir a mesma ingesta calórica e, o mais importante, o fato dos ratos CTR (verde) e CTR+Ang-(3-4) (amarelo) estarem intercalados indica que pertencem à mesma população.

A Figura 21B mostra – numa única função retilínea – uma correlação positiva entre ingesta de Na⁺ e ingesta energética independentemente do tipo de dieta, do conteúdo de Na⁺ e da administração de Ang-(3–4), sugerindo que o apetite de Na⁺ seria quem condicionaria a ingesta de alimento (e de calorias). Mais uma vez e apesar de uma única função linear ter se ajustado a todos os pontos, os menores valores de ingesta calórica e de ingesta de Na⁺ foram encontrados nos ratos com sobrepeso que



Figura 21. A correlação de ingesta de ração e ingesta de Na⁺ com ingesta calórica, mostra como estas três variáveis apresentam, ao mesmo tempo, os menores valores em ratos com sobrepeso que receberam Ang-(3-4). (A): Correlação entre ingesta de ração e ingesta de energia em ratos CTR e HL que receberam ou não Ang-(3-4). A correlação entre as duas variáveis foi inicialmente analisada por mínimos quadrados em cada um dos quatro grupos representados com códigos de cores diferentes: CTR, n = 10 (verde); HL, n = 10 (azul); CTR + Ang-(3–4), n = 11 (amarelo); HL, n = 11 (vermelho). Cada círculo colorido representa um rato (superpostos em alguns casos). As inclinações nos grupos CTR e CTR + Ang-(3-4) não foram diferentes (P>0,9999), assim como não o foram as correspondentes aos grupos HL e HL + Ang-(3-4) (P>0,9999), como mostrado através de análises por múltiplas comparações. Como houve diferenças entre CTR mais CTR + Ang-(3-4) vs HL mais HL + Ang-(3-4) (P<0,0001) foram gerados dois conjuntos de dados e duas funções lineares foram obtidas: (i) y = -0.07 + 3.9x (n = 21, R = 0.9997, P<0.0001) (dieta CTR), e (*ii*) y = -0.16 + 5.8x (n = 21, R = 0,9979, P<0,0001) (dieta HL). O reguadro ① mostra que a maioria dos círculos correspondentes ao grupo HL + Ang-(3-4) (8/11) se encontram agrupados nos níveis de corte de 1,0 g de ração em 24 h por 100 g MC (linha horizontal) e 6,0 kcal em 24 h por 100 g MC (linha vertical). O painel ② apresenta os restantes dados correspondentes a ratos HL e a função única correspondente ao conjunto CTR mais CTR + Ang-(3-4). (B): Correlação entre ingesta de Na⁺ e ingesta de energia em ratos CTR e HL que receberam ou não Ang-(3-4). A correlação entre as duas variáveis foi primeiro analisada em cada um dos quatro grupos por mínimos quadrados. Cada círculo corresponde a um rato com o mesmo código de cores que em A. Como as quatro inclinações não foram diferentes entre si (P = 0.8973), todos os pontos foram agrupados e uma única função foi assim obtida: y = 0.3 + 70.2x (n = 41, R = 0.9914, P<0,0001). O requadro ① mostra que a maioria dos círculos correspondentes ao grupo HL + Ang-(3-4) (também 8/11) se encontram agrupados nos níveis de corte de 0,080 meguiv Na⁺ em 24 h por 100 g MC (linha horizontal) e 6,0 kcal em 24 h por 100 g MC (linha vertical), enquanto que os pontos correspondentes aos outros três grupos (CTR, HL e CTR + Ang-(3-4)) se encontram misturados ao longo da continuação da linha reta dentro do painel principal (2).

receberam Ang-(3–4). A maioria deles (8/11) ① (pontos em **vermelho**) encontrou-se segregado abaixo das linhas de corte de 5,5 kcal em 24 h/g BM e 0,9 mequiv Na⁺ em 24 h/100 g BM. A distribuição homogênea dos pontos correspondentes aos grupos CTR, HL e CTR+Ang-(3–4) ao longo da mesma função no painel principal ②, confirma que esses ratos pertencem à mesma população em termos de ingesta energética e de Na⁺, como já apreciado na Figura 19.

4.4. Balanço corporal de Na⁺ em ratos com sobrepeso: positivo e alto, se tornando acentuadamente negativo após administração de Ang-(3–4)

Três observações emergem quando se analisa inicialmente a excreção urinária de Na⁺ em 24 h ($U_{Na}V$) (Figura 20): (i) os ratos com sobrepeso, apesar de ingerirem a mesma quantidade de Na⁺ que os CTR, como mostrado na Figura 20, apresentam uma U_{Na}V 40% menor; (ii) a U_{Na}V nos mesmos ratos tratados com Ang-(3–4) foi semelhante àquela dos não tratados, mas coexistindo com um acentuado decréscimo (~60%) na ingesta de Na⁺; (iii) não houve efeito da Ang-(3–4) em ratos CTR, repetindo assim o observado quando se analisaram outros parâmetros com PAS, ingesta de alimento (e energética) e balanço de Na⁺. Novamente, agora para uma variável que depende fenomenologicamente de processos de transporte renal a falta de efeito, tanto na ingesta quanto na excreção, revela novamente o que já se tornou um denominador comum e que já foi definido como a falta de efeito da Ang-(3-4) na ausência de um "microambiente pró-hipertensivo" (Dias et al., 2014). No caso dos ratos HL hipertensos (Figuras 16 e 17) a aparente falta de efeito mostra – na verdade - uma acentuada inibição da reabsorção de Na⁺ ao nível de túbulos renais, permitindo uma excreção urinária aumentada apesar da inibição da ingesta que a Ang-(3-4) provocou.

A comparação dos resultados da ingesta de Na⁺ (I) (Figura 18) com os da U_{Na}V (U) (Figura 19) é apresentada na Figura 23A e a diferença I - U (balanço diário) na Figura 23B. A comparação entre a ingesta de Na⁺ e a U_{Na}V demonstra que o balanço foi ligeiramente positivo (na faixa 0,01–0,03 mequiv em 24 h/100 g BM nos ratos CTR e, como já mencionado sem ou com um pequeno efeito da Ang-(3–4), como se depreende visualizando a 1^a e a 3^a colunas da Figura 23B. Possivelmente, essa pequeno balanço de Na⁺ positivo corresponde à pequena parcela de Na⁺


Figura 22. A administração de Ang-(3–4) não altera a excreção urinária de Na⁺ em 24 h, tanto em ratos CTR quanto em ratos HL. Excreção urinária de Na⁺ em 24 h ($U_{Na}V$) em ratos dos grupos CTR e HL depois de 106 dias, que receberam ou não Ang-(3–4) como indicado na abscissa. As barras correspondem a médias ± erro padrão. As diferenças foram analisadas utilizando ANOVA-1 fator seguido do teste de Bonferroni para pares selecionados. Valores de *P* indicados dentro da figura; n = 10 (CTR), n = 10 (HL), n = 11 (CTR + Ang-(3–4) e HL + Ang-(3–4)).

ingerido que se elimina no suor hiponatrêmico dos ratos, que contem em torno de 25 mequiv Na⁺/I (Quatrale & Laden, 1968). Esta diferença sobe para 0,06 mequiv Na⁺ em 24 h/100 g BM nos ratos HL (2^a coluna) o que significaria a acumulação de ~1 mequiv Na⁺/I de água extracelular por dia³ e um total de ~50 mequiv Na⁺/I de água extracelular ao longo da metade final do estudo⁴. Já a primeira vista esta acumulação levaria a [Na⁺]_{pls} para valores extremamente altos ou a uma expansão isotônica do fluído extracelular, ambas incompatíveis com a vida, discussão que será retornada em seguida. A U_{Na}V aumentou 100% em relação à ingesta após administração de Ang-(3–4), correspondendo a um balanço de Na⁺ corporal diário negativo em torno de -0,06 mequiv/100 g BM (4^a coluna); o que significa cancelar totalmente o acúmulo diário ocorrido antes de sua administração.

As perguntas seguintes durante o desenvolvimento do trabalho foram: (i) em qual compartimento foi sendo acumulando o Na⁺ da dieta nos ratos com sobrepeso à medida que foi transcorrendo o tempo? (ii) O plasma destes ratos se tornou hipernatrêmico? (iii) Após a administração de Ang-(3–4), o plasma dos animais com sobrepeso se tornou hiponatrêmico em decorrência de ser U_{Na}V>>Ingesta Na⁺? As três perguntas foram respondidas com os experimentos apresentados na Figura 23.

Neste ponto e a partir da combinação destes últimos resultados, uma nova questão emergiu: como poderia a acumulação de Na⁺ em compartimentos osmoticamente silenciosos estar associada à gênese da hipertensão que os ratos HL desenvolveram? Além da pele (Titze & Luft, 2017; Canaud *et al.*, 2019), os glicosaminoglicanos da camada superficial do endotélio (Figura 11) constituem um importante compartimento intermediário para a acumulação osmoticamente inativa de Na⁺ porque ela se encontra em contato direto com o Na⁺ circulante antes de que ele passe para os glicosaminoglicanos intersticiais (Olde Engberink *et al.*, 2014). É conhecido há mais de 35 anos que os glicosaminoglicanos desempenham um papel importante na patofisiologia da hipertensão (Reynerston *et al.*, 1986), atuando especialmente nos vasos de resistência (Castro *et al.*, 1999; Roccabianca *et al.*, 2014)

³ Estimativa à qual se chega assumindo que um rato tem 80% de sua massa corporal em água, sendo 55% intracelular e 35% extracelular.

⁴ Assumindo que esse balanço positivo diário se estabeleceu quando os ratos começaram a se tornar hipertensos.



Figura 23. A administração de Ang-(3–4) provoca um acentuado balanço negativo de Na⁺ em ratos com sobrepeso alimentados com a dieta HL, mas não em ratos CTR. (A): Diferenças entre ingesta de Na⁺ (I) e excreção urinária de Na⁺ em 24 h (U) em ratos CTR e HL que receberam ou não Ang-(3–4) nos últimos dois dias de exposição às dietas diferenciadas (grupos separados pelas linhas verticais pontilhadas), como indicado na abscissa. As barras correspondem a médias \pm erro padrão. As diferenças dentro de cada grupo foram analisadas empregando teste *t* de Student não pareado e os valores de *P* estão indicados na figura. Os valores de n são aqueles indicados para cada condição na legenda da Figura 21. (B): Balanço corporal de Na⁺ em 24 h (diferença entre as médias de ingesta e de U_{Na}V apresentadas no painel **A**. # corresponde a *P* = 0,0347 na comparação entre ingesta e excreção de Na⁺ para o grupo HL em **A**; ## corresponde a *P* = 0,0030 na comparação para o grupo HL + Ang-(3–4).

e suas alterações - como as provocadas pelos agentes mostrados na Figura 10 culminam na gênese de hipertensão (Olde Engberink et al., 2014). Poder-se-ia postular que quantidades elevadas de tecido adiposo perivascular (PVAT), o equivalente do tecido adiposo visceral aumentado que apresentam os ratos HL (Figuras 14 e 15), contribui para esta perturbação e, consequentemente, para um tônus vascular alterado (Maenhaut & Van de Voorde, 2011) e para uma distensibilidade de grandes vasos diminuída (Resnick et al., 1997), através da secreção de citocinas e adipocinas (Costa et al., 2018). É importante destacar, dando suporte a esta ideia, que mediadores inflamatórios secretados por células muito abundantes no tecido adiposo visceral, como macrófagos (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003), são considerados osmosensores e reguladores da ligação de Na⁺ em compartimentos livres de água e, portanto, osmoticamente inativos (Wiig et al., 2018). Todos estes processos e mecanismos poderiam estar subjacentes nos potenciais efeitos adversos que o Na⁺ tissular alto exerce em pacientes com resistência à insulina, como demonstrado em estudos de imageamento de ²³Na através de ressonância magnética (MRI) (Deger et al., 2017), na hipertensão (Bottomley, 2016) e em doenças cardiovasculares de maneira geral como já mencionado acima (Titze & Luft, 2017).

4.5. Transporte ativo de Na⁺ aumentado em túbulos proximais renais de ratos com sobrepeso: retorno aos valores CTR após administração de Ang-(3–4)

A Figura 25 mostra suprarregulação da (Na⁺+K⁺)-ATPase (painel **A**) e da Na⁺-ATPase (resistente à ouabaína) (painel **B**) de células de túbulos proximais em 80% e 20%, respectivamente. Esta ativação indica que tanto a reabsorção maciça de Na⁺ mediado pela primeira, quanto o ajuste fino mediado pela segunda (Vieyra *et al.*, 1986) se encontram aumentadas em animais com sobrepeso alimentados com uma dieta HL, que se tornaram hipertensos num período em que também acumularam Na⁺ progressivamente. Esta suprarregulação foi suprimida pela administração de Ang-(3– 4) que, novamente, não teve nenhuma influência nas atividades medidas empregando membranas de ratos CTR. A suprarregulação das ATPases transportadoras de Na⁺



Figura 24. A diminuída concentração plasmática de Na⁺ de ratos alimentados com a dieta HL retorna para valores do grupo CTR após administração de Ang-(3–4). As barras representam médias \pm erro padrão de determinações de [Na⁺]_{pis} de ratos alimentados com dietas CTR ou HI durante 106 dias e que receberam ou não Ang-(3–4) nos últimos dois dias, conforme mostrado na abscissa. As médias foram comparadas empregando ANOVA-1 fator seguido do teste de Bonferroni para pares selecionados (CTR: n = 21; HL: n = 20; CTR + Ang-(3–4): n = 20; HL + Ang-(3–4): n = 20). Valores de *P* inseridos na figura.

80% da reabsorção do Na⁺ filtrado nos glomérulos(Aires, 2018) – aparece então como um dos mecanismos centrais responsáveis por uma reabsorção aumentada de Na⁺ com diminuição da sua U_{Na}V, permitindo assim seu acúmulo progressivo nas estruturas e através dos processos propostos e discutidos no ponto anterior **4.4.** Esta ideia é corroborada pela observação de que a administração de Ang-(3–4) a ratos HL levou simultaneamente à recuperação das ATPases transportadoras de Na⁺ para os níveis encontrados nos ratos CTR e promoveu o acentuado balanço negativo de Na⁺ observado na Figura 23.

Novamente aqui as ações da Ang-(3-4) em túbulos proximais – não vistas em ratos CTR – se tornaram significativas em condições que culminaram numa reabsorção aumentada de Na⁺ e hipertensão bem estabelecida, *i.e.* no microambiente pró-hipertensivo encontrado no interior do tecido renal e do qual a suprarregulação dos AT₁R e a infrarregulação dos AT₂R (Figura 18) são dois dos expoentes. A suprarregulação da via de sinalização acoplada a AT1R é central em processos que culminam com hipertensão, como já apresentado e discutido na subseção 4.2., porque esta via é considerada o passo inicial na modulação do manejo coordenado de Na⁺ em diferentes segmentos tubulares (Aperia et al., 1996; Ohsawa et al., 2014), e ela participa diretamente da regulação do seu transporte ativo em túbulos proximais mediado pelas duas ATPases transportadoras co-localizadas na mesma membrana basolateral (Aperia et al., 1994; Silva et al., 2014b). Deve ser ressaltado que a supressão da suprarregulação destas ATPases em condições de simultânea diminuição da ingesta (Figura 20) é a circunstância que levou ao acentuado balanço negativo de Na⁺ (Figura 23), apesar da falta de efeito na magnitude da U_{Na}V (Figura 22).

Outros componentes do chamado "microambiente pró-hipertensivo", gerado por uma hiperatividade do RAS local a partir de uma via de AT₁R suprarregulada, merecem menção no contexto da suprarregulação da Na⁺-ATPase resistente à ouabaína – portanto do ajuste fino de uma reabsorção aumentada de Na⁺ – e da temática central da presente tese. A primeira se relaciona com o importante papel que elementos chave das vias de sinalização acopladas a AT₁R, como a PKC desempenham na regulação desta ATPase em túbulos proximais (Lara *et al.*, 2008; Rangel *et al.*, 2001, 2002, 2005). A segunda é a possível contribuição que espécies reativas de O₂ – cuja formação é especialmente estimulada por Ang II na obesidade



Figura 25. A suprarregulação da (Na⁺+K⁺)-ATPase (sensível à ouabaína) e da Na⁺-ATPase (resistente à ouabaína e sensível à furosemida) de células de túbulos proximais de ratos com sobrepeso que receberam a dieta HL é revertida pela administração de Ang-(3–4): ausência de efeito em ratos CTR. (A): (Na⁺+K⁺)-ATPase. (B): Na⁺-ATPase. As barras correspondem a médias \pm erro padrão de atividades obtidas empregando preparações diferentes de membranas de células tubulares proximais de ratos que receberam dietas CTR ou HL, tratados ou não com Ang-(3–4), como indicado nas abscissas. As diferenças foram analisadas empregando ANOVA-1 fator seguido de teste de Bonferroni para pares selecionados (valores de *P* indicados dentro dos painéis; n = 6 e n = 5 preparações de CTR e HL obtidas de ratos não tratados ou tratados com Ang-(3–4), respectivamente.

(Ramalingam *et al.*, 2017) – dariam, nos ratos com sobrepeso, para o estímulo concertado da Na⁺-ATPase (Bełtowski *et al.*, 2007) que é também ativada por leptina na obesidade (Bełtowski *et al.*, 2004, 2007). Alterações redundantes provocadas por um RAS suprarregulado, afetando a regulação da Na⁺-ATPase responsável pelo ajuste fino da reabsorção proximal de Na+, confeririam especial significado patogênico ao aumento de sua atividade observado na Figura 25B.

O transporte ativo de Na⁺ também se encontra suprarregulado num segmento do néfron caracterizado pela sua relativa impermeabilidade à água: o ramo ascendente grosso da alça de Henle (Aires, 2018). A Figura 26A mostra uma atividade aumentada da (Na⁺+K⁺)-ATPase em torno de 80% que, a diferença do encontrado em túbulos proximais, não se acompanhou de um aumento da atividade da Na⁺-ATPase resistente à ouabaína (Figura 26B). Embora o transporte ativo de Na⁺ desacoplado do contratransporte de K⁺ no ramo ascendente grosso tenha sido demonstrado de considerável magnitude à época de suas primeiras descrições 50 anos atrás (Whittembury & Proverbio, 1970; de Jairala et al., 1972), a falta de resposta a estímulos como os que certamente contribuíram para sua suprarregulação em túbulos proximais parece indicar diferenças no microambiente regulatório do córtex externo (onde se encontram os túbulos proximais e a medula externa (região onde se encontra o ramo ascendente grosso da alça de Henle), capazes de influir de maneira seletiva na atividade da Na⁺-ATPase. Poder-se-ia postular que uma seletiva e preservada produção de prostaglandinas, que contrarregula os efeitos de Ang II na medula renal mas não no córtex (Parekh & Zou, 1996), seria responsável pela falta de hiperativação da Na⁺-ATPase, sem proteger a Na⁺+K⁺)-ATPase do ramo ascendente da influência de alterações provocadas pela dieta HL.

A suprarregulação do transporte ativo de Na⁺ mediado pela (Na⁺+K⁺)-ATPase neste segmento do néfron poderia ter relevância na homeostasia alterada do Na⁺ corporal no sobrepeso associado a hipertensão. Isto porque os fluxos hiperosmóticos de Na⁺ na alça de Henle (Rocha & Kokko, 1974) são centrais no estabelecimento do gradiente córtico-medular do íon (Haneder *et al.*, 2014) que torna os rins os órgãos chave para a regulação de volume e composição dos compartimentos líquidos. A reabsorção de NaCl não acoplada a água gera um fluído tubular diluído, permitindo que este "efeito primário" se transforme no principal mecanismo que permite a operação do sistema multiplicador de contracorrente



Figura 26. Suprarregulação da (Na⁺+K⁺)-ATPase, mas não da Na⁺-ATPase resistente à ouabaína, nas células do ramo ascendente grosso da alça de Henle em rins de ratos com sobrepeso. (A): (Na⁺+K⁺)-ATPase. (B): Na⁺-ATPase. As barras correspondem a médias \pm erro padrão de atividades obtidas empregando preparações diferentes de membranas de células tubulares proximais de ratos que receberam dietas CTR ou HL, tratados ou não com Ang-(3–4), como indicado na abscissa. As diferenças foram analisadas empregando ANOVA-1 fator seguido de teste de Bonferroni para pares selecionados (valores de *P* indicados dentro do painel; n = 6 e n = 5 preparações obtidas de ratos CTR e HL não tratados ou tratados com Ang-(3–4), respectivamente).

aumentando a osmolaridade medular. Esse aumento de osmolaridade intersticial poderia ter consequências desestabilizantes sobre proteínas e diferentes processos de transporte nesta parte no parênquima renal (Somero, 1986; Vieyra *et al.*, 1991), com impacto na densidade celular e na oxigenação, processos cuja operação se encontra modificada em diferentes condições patológicas nas quais o gradiente córtico-medular de Na⁺ se altera (Haneder *et al.*, 2014; Moon *et al.*, 2014). Muito embora as observações de Haneder *et al.* e de Moon *et al.* se refiram a situações de gradiente diminuído abre-se a possibilidade de que o gradiente aumentado leve também a lesões renais como resultado do efeito desestabilizante de proteínas que a hiperosmolaridade provoca.

4.6. O sobrepeso, a hipertensão e as alterações da homeostasia corporal de Na⁺ que a dieta hiperlipídica provoca fazem parte de uma síndrome metabólica

Os resultados apresentados a seguir apresentam evidências de que as modificações de massa corporal, da pressão arterial e da homeostasia de Na⁺ provocadas pela dieta hiperlipídica se inserem num quadro de síndrome metabólica, com algumas características intrigantes. As Figuras 27 e 28 começam mostrando isto em termos de perfil lipídico. Embora a concentração plasmática de colesterol total seja semelhante em ratos CTR e HL (Figura 27), encontrou-se que a diminuição de concentração de triglicerídeos (Figura 28A) se acompanha também de uma diminuição de ~50% da fração de lipoproteínas de alta densidade (Figura 28B) e de um aumento de ~100% da fração de lipoproteínas de baixa densidade (Figura 28C). As alterações opostas que foram observadas nas lipoproteínas são cardinais nas dislipidemias encontradas na síndrome metabólica (Chan et al., 2004; Rizzo & Berneis, 2007) e constituem expressão de alterados fluxos de ácidos graxos do tecido adiposo para o fígado e do remodelamento bioquímico das lipoproteínas uma consequência global da resistência à insulina e da acumulação de gordura visceral (Chan & Watts, 2008). Chama, no entanto a atenção a acentuada diminuição de triglicerídeos mostrada na Figura 28A, o que introduz uma singularidade chamativa à dislipidemia causada pela dieta acentuadamente hiperlipídica. A particular proporção lipídeos/glicídios da dieta HL (Tabela 1) poderia ser responsável por uma diminuída síntese de ácidos graxos no fígado, combinada com um aumento de atividade de enzimas lipolíticas num cenário de exacerbada atividade simpática, com preservação das habituais alterações no remodelamento das lipoproteínas. O acentuado depósito de gordura visceral (Figura 14) indica que essa poderia ser também uma das causas do não aumento da concentração de triglicerídeos plasmáticos. As alterações morfológicas observadas nos adipócitos (Figura 15) poderiam ter seu correlato funcional num processo de acentuada síntese e depósito de triglicerídeos em toda a gordura visceral. Em seres humanos, adipócitos da gordura visceral – de tamanho maior, como observado na Figura 14 em ratos – tem uma captação aumentada de triglicerídeos com entrada celular de glicose diminuída o que indica resistência à insulina (Mårin *et al.*, 1992).

O quadro de síndrome metabólica nos ratos HL se completa com uma moderada – porém significativa – glicemia no jejum (Figura 29A) e por intolerância à glicose (Figura 29B, C), já predito pelas alterações do perfil lipídico. Esta resistência à insulina pode ser atribuída especialmente a dois fatores: o estímulo da secreção de citocinas pelo tecido adiposo visceral (Garbarino et al., 2009) e pelo acúmulo de Na⁺ tissular (Deger et al., 2018). O transporte renal alterado de Na⁺ nos túbulos proximais e no ramo ascendente da alça de Henle (Figuras 25 e 26), que contribuiria para a reabsorção aumentada de um Na⁺ que se acumula silenciosamente em glicosaminoglicanos como resultado de estímulos pró-hipertensivos como o estresse oxidativo e a inflamação (Figura 11), completa a rede mecanística que associa adiposidade abdominal, resistência à insulina, hipertensão e risco cardiovascular (Strazzullo et al., 2001). Embora a hiperglicemia no jejum seja leve e a resistência à insulina também moderada, trata-se de ratos jovens, como mencionado ao apresentar o desenho experimental. Como já mencionado na Introdução, a obesidade juvenil, para além de levar a um agravamento progressivo da resistência à insulina com o transcorrer do tempo, aumenta significativamente o risco cardiovascular na idade adulta, associado ou não a uma síndrome metabólica, como o demonstra a avaliação e comparação de diferentes parâmetros circulatórios (Nadeau et al., 2011).

Por fim, nesta tese foi investigada a evolução do ácido úrico plasmático, cuja associação a alterações na homeostasia de Na⁺ corporal e à hipertensão está sendo redescoberta (Albu *et al.*, 2020), especialmente em relação à rigidez arterial nos grandes vasos (Resnick *et al.*, 1997), proposta neste estudo como um dos principais processos associados ao aumento observado na PAS (Figura 16).



Figura 27. Os níveis de colesterol total no plasma de ratos com sobrepeso que receberam a dieta HL são semelhantes aos dos ratos CTR. As barras correspondem a médias \pm erro padrão (n = 19) de determinações realizadas no soro de ratos CTR e HL, como indicado na abscissa, 106 dias após exposição às dietas. A comparação (valor de *P* mostrado na figura) foi realizada empregando teste *t* de Student não pareado.



Figura 28. Ratos com sobrepeso alimentados com dieta HL apresentam síndrome metabólica com uma dislipidemia de intrigante perfil: triglicerídeos significativamente diminuídos. Grupos indicados nas abscissas. (A): Triglicerídeos. (B): Lipoproteínas de alta densidade. (C): Lipoproteínas de baixa densidade. As barras correspondem a médias \pm erro padrão (n = 19). Os três componentes lipídicos foram analisados no dia 106 de exposição às dietas em cada uma das 19 amostras de soro. As diferenças (valores de *P* em cada painel) foram analisadas empregando teste *t* de Student não pareado.

Hiperuricemia em humanos foi associada a dislipidemia, hipertensão e síndrome metabólica (Ali *et al.*, 2018), 35 anos depois de um pioneiro estudo de quase 40 anos atrás entre operários de uma fábrica de máquinas de escrever na Itália, mostrando a associação existente entre metabolismo do ácido úrico, reabsorção proximal de Na⁺ e hiperinsulinemia, tendo a resistência à insulina como elo fisiopatológivo(Cappuccio *et al.*, 1993).

A Figura 30 mostra que o ácido úrico sérico mais do que dobrou nos ratos com sobrepeso que receberam a dieta HL, hipertensos, com alterações na distribuição corporal de Na⁺, com dislipidemia, e com resistência à insulina, e cuja PAS aumentada – possivelmente devido a uma acumulação perivascular de Na⁺ aumentada – foi revertida pela Ang-(3–4). Que, novamente, não teve qualquer efeito nos níveis de ácido úrico de ratos CTR normotensos. Estas observações, tomadas em conjunto, sugerem fortemente que a hiperuricemia resultou de um aumento na reabsorção de ácido úrico no seu principal segmento tubular de transporte, o túbulo proximal (So & Thorens, 2010), estimulado por um RAS suprarregulado. No estudo de Cappuccio *et al.*, acima mencionado, foi encontrada uma alta correlação entre ácido úrico plasmático e clearance de Li⁺, *i.e.* reabsorção tubular de Na⁺.



Figura 29. Leve hiperglicemia no jejum e tolerância à glicose diminuída em ratos HL. (A): Depois de 98 dias de dieta (154 dias de vida) os animais foram submetidos a jejum de 12 h para uma primeira determinação da glicemia (grupos indicados na abscissa). As barras correspondem a médias \pm erro padrão (n = 15 para o grupo CTR; n = 16 para o grupo HL). A diferença foi investigada empregando teste t de Student não pareado (valor de P mostrado no painel). (B) Após a extração do sangue para a determinação da glicemia no jejum, os ratos receberam glicose por gavagem (seta) e as concentrações plasmáticas foram medidas nos tempos indicados na abscissa. Os pontos correspondem a médias \pm erro padrão (n = 15 para o grupo CTR; n = 16 para o grupo HL). A comparação estatística entre as médias de valores de glicemia foi realizada empregando ANOVA-1 fator seguido de teste de Bonferroni para pares selecionados, que foram aqueles CTR e HL no mesmo tempo após a administração de glicose (*: P = 0,0017 aos 15 min; P = 0,0016 aos 30 min; P = 0,0160 aos 120 min). A área cinza escura mostra a área extra embaixo da curva em ratos HL. (C): Quantificação da área embaixo das curvas correspondentes aos ratos CTR e HL. As barras representam médias ± erro padrão das áreas correspondentes a cada rato em cada grupo. A diferença foi investigada empregando teste t de Student não pareado (valor de P mostrado no painel).



Figura 30. A hiperuricemia que acompanha a hipertensão arterial em ratos com sobrepeso alimentados com a dieta HL é revertida pela Ang-(3–4). As barras correspondem a médias \pm erro padrão de determinações de ácido úrico plasmático realizadas após 106 dias de exposição às dietas diferenciadas – os dois últimos dias recebendo ou não Ang-(3–4) – como indicado na abscissa. As diferenças foram avaliadas empregando ANOVA-1 fator seguido do teste de Bonferroni para pares selecionados. Valores de *P* para as comparações selecionadas indicados na figura; n = 14 (CTR e HL), n = 15 (CTR + Ang-(3–4)), n = 12 (HL + Ang-(3–4)).

5. Conclusões, significado e limitações

5.1. Conclusões

Uma dieta hipercalórica rica em lipídeos, com um conteúdo de Na⁺ mais alto que o normal, a ratos jovens (58 dias de idade) é capaz de induzir uma moderada hipertensão arterial sistólica como resultado de alterações na distensibilidade dos grandes vasos. A Ang-(3–4) o antagonista fisiológico mais potente da Ang II reverteu o quadro hipertensivo, ao mesmo tempo em que suprimiu a suprarregulação de ATPases transportadoras de Na⁺ em túbulos renais, promoveu uma acentuada mobilização de Na⁺ progressivamente acumulado em compartimentos osmoticamente silenciosos, diminuiu sua reabsorção em túbulos renais e estimulou sua excreção urinária, conjuntamente com uma pronunciada diminuição da ingesta. A hiperatividade da via de sinalização associada a AT₁R (também revertida por Ang-(3-4)) e a infrarregulação da via de AT2R provocadas pela dieta rica em lipídeos e Na⁺ constituem um dos mecanismo que levaram à hiperativação da reabsorção de Na⁺ e, simultaneamente a uma expansão das reservas do íon nesses compartimentos osmoticamente inativos. Esta dieta levou a uma síndrome metabólica com um HDL diminuído, LDL aumentado e uma diminuição de triglicerídeos plasmáticos que poderia ser atribuído a uma acentuada deposição em adipócitos alterados da gordura visceral. A resistência à insulina – comprovada por uma alterada curva de tolerância à glicose – e a intensa hiperuricemia poderiam ser também consequência de um RAS alterado. Os achados novos foram que doses orais de Ang-(3-4), no intervalo de 48 h, foram suficientes para restaurar a pressão arterial para níveis controle e tornar o balanço de Na⁺ acentuadamente negativo. Estas conclusões se encontram resumidas de maneira gráfica na Figura 31.

5.2. Significado

Este estudo mostra que a hipertensão associada ao sobrepeso com importante aumento de adiposidade visceral, a qual se desenvolve com acumulação de Na⁺ em depósitos tissulares livres de água, pode ser completamente revertida pela administração oral de Ang-(3–4). O peptídeo normaliza as suprarreguladas ATPases renais transportadoras de Na⁺ e a densidade de AT₁R, causando simultâneo aumento da U_{Na}V, efeitos na economia corporal de Na⁺ que se complementa ao induzir uma

diminuição acentuada na ingestão de sal. Estas descobertas trazem uma visão contemporânea original de como um RAS hiperativado pode ser contrarregulado pelo mais curto peptídeo derivado de angiotensinas, com potenciais aplicações para o tratamento de elevada pressão arterial em humanos.

5.3. Limitações

Este estudo apresenta uma limitação. Apesar da evidência de uma mobilização de Na+ seguida de excreção urinária induzida por Ang-(3–4), o Na+ depositado nos glicosaminoglicanos em torno dos grandes vasos não foi medido diretamente. A utilização de MRI empregando ²³Na permitiria refinar o estudo da dinâmica da acumulação de Na⁺ durante o período em que os ratos foram adquirindo sobrepeso e se tornando hipertensos e possibilitaria acompanhar a sua liberação pela ação da Ang-(3–4). Estudos adicionais empregando ²³Na MRI poderão clarear este panorama.





6. Referências

- Abadir, P.M. Foster, D.B. Crow, M. Cooke, C.A. Rucker, J.J. Jain, A. Smith, B.J. Burks, T.N. Cohn, R.D. Fedarko, N.S. Carey, R.M. O'Rourke, B. and Walston, J.D. Identification and characterization of a functional mitochondrial angiotensin system. *Proc Natl Acad Sci USA*, **108**, 14849–14854, 2011.
- Abadir, P.M. Walston, J.D. and Carey, R.M. Subcellular characteristics of functional intracellular renin-angiotensin systems. *Peptides*, **38**, 437–445, 2012.
- Alexander, B. T. Cockrell, K. L. Massey, M. B. Bennett, W. A. Granger, J. P. Tumor necrosis factor-alpha-induced hypertension in pregnant rats results in decreased renal neuronal nitric oxide synthase expression. *Am J Hypertens*, **15**, 170–175, 2002.
- Albu, A. Para, I. Porojan, M. Uric Acid and Arterial Stiffness. *Ther Clin Risk Manag*, **16**, 39–54, 2020.
- Ali, N. Perveen, R. Rahman, S. Mahmood, S. Rahman, S. Islam, S. Haque, T. Sumon,
 A. H. Kathak, R. R. Molla, N. H. Islam, F. Mohanto, N. C. Nurunnabi, S. M.
 Ahmed, S. Rahman, M. Prevalence of hyperuricemia and the relationship between serum uric acid and obesity: A study on Bangladeshi adults. *Plos one*, 13, e0206850, 2018.
- AlZaim, I. Hammoud, S. H. Al-Koussa, H. Ghazi, A. Eid, A. H. El-Yazbi, A. F. Adipose Tissue Immunomodulation: A novel therapeutic approach in cardiovascular and metabolic diseases. *Front Cardiovasc Med*, **7**, 602088, 2020.
- Aperia, A. Holtbäck, U. Syrén, M. L. Svensson, L. B. Fryckstedt, J. Greengard, P. Activation/deactivation of renal Na⁺,K⁺-ATPase: a final common pathway for regulation of natriuresis. *Faseb J*, **8**, 436–439, 1994.
- Aperia, A. Fryckstedt, J. Holtback, U. Belusa, R. Cheng, X. Eklöf, A. Li, D. Wang, Z. Ohtomo, Y. Cellular mechanisms for hi-directional regulation of tubular sodium reabsorption. *Kidney Inte*, **49**, 1743–1747, 1996.

- de Araujo, T.M. Razolli, D.S. Correa-da-Silva, F. de Lima-Junior, J.C. Gaspar, R.S. Sidarta-Oliveira, D. Victorio, S.C. Donato, J. Jr. Kim, Y.B. Velloso, L.A. The partial inhibition of hypothalamic IRX3 exacerbates obesity. *EBioMedicine*, **39**, 448–460, 2019.
- de Araujo, T.M. & Velloso, L.A. Hypothalamic IRX3: A New Player in the Development of Obesity. *Trends Endocrinol Metab*, Epub ahead of print 2020.
- Axelband, F. Dias, J. Miranda, F. Ferrão, F. M. Reis, R. I. Costa-Neto, C. M. Lara, L. S. Vieyra, A. Angiotensin-(3–4) counteracts the Angiotensin II inhibitory action on renal Ca2⁺-ATPase through a cAMP/PKA pathway. *Regul Pept*, **155**, 81–90, 2009a.
- Axelband, F. Dias, J. Miranda, F. Ferrão, F. M. Barros, N. M. Carmona, A. K. Lara, L.
 S. Vieyra, A. A scrutiny of the biochemical pathways from ng II to Ang-(3–4) in renal basolateral membranes. *Regul Pept*, **158**, 47–56, 2009b.
- Axelband, F. Dias, J. Miranda, F. Ferrão, F. M. Reis, R. I. Costa-Neto, C. M. Lara, L. S. Vieyra, A. Angiotensin-(3–4) counteracts the Angiotensin II inhibitory action on renal Ca2⁺-ATPase through a cAMP/PKA pathway. *Regul Pept*, **177**, 27–34, 2012.
- Bahia, L. Coutinho, E. S. Barufaldi, L. A. Abreu Gde, A. Malhao, T. A. de Souza, C.
 P. Araujo, D. V. The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. *BMC Public Health*, **12**, 440–447 2012.
- Bahia, L. R. & Araújo, D. V. Impacto econômico da obesidade no Brasil. *Revista HUPE*, **13**, 13–17, 2014.
- Barker, D. J. Fetal nutrition and cardiovascular disease in later life. *Br Med Bull*, **53**, 96–108, 1997a.
- Barker, D. J. Intra-uterine programming of the adult cardiovascular system. *Curr Opin Nephrol Hypertens,* **6**, 106–110, 1997b.

- Beltowski, J. Wojcicka, G. Marciniak, A. Jamroz, A. Oxidative stress, nitric oxide production, and renal sodium handling in leptin-induced hypertension. *Life Sci*, 74, 2987–3000, 2004.
- Beltowski, J. Borkowska, E. Wojcicka, G. Marciniak, A. Regulation of renal ouabainresistant Na⁺-ATPase by leptin, nitric oxide, reactive oxygen species, and cyclic nucleotides: implications for obesity-associated hypertension. *Clin Exp Hypertens*, **29**, 189–207, 2007.
- Bhurosy, T. & Jeewon, R. Overweight and obesity epidemic in developing countries: a problem with diet, physical activity, or socioeconomic status? ScientificWorldJournal, 964236, 2014.
- Bottomley, P. A. Sodium MRI in human heart: a review. *NMR Biomed*, **29**, 187–196, 2016.
- Bruce, E. B. & de Kloet, A. D. The intricacies of the renin-angiotensin-system in metabolic regulation. *Physiol Behav*, **178**, 157–165, 2017a.
- Bryant, R.W. Epstein, A.N. Fitzsimons, J.T. Fluharty, S.J. Arousal of a specific and persistent sodium appetite in the rat with continuous intracerebroventricular infusion of angiotensin II. *J Physiol*, **301**, 365–382, 1980.
- Buonafine, M. Martinez-Martinez, E. Jaisser, F. More than a simple biomarker: the role of NGAL in cardiovascular and renal diseases. *Clin Sci (Lond)*, **132**, 909–923, 2018.
- Caballero, B. & Rubinstein, S. Environmental factors affecting nutritional status in urban areas of developing countries. *Arch Latinoam Nutr*, **47**, 3–8, 1997.
- Caird, J. Kavanagh, J. O'Mara-Eves, A. Oliver, K. Oliver, S. Stansfield, C. Thomas, J. Does being overweight impede academic attainment? A systematic review. *Health Education Journal*, **73**, 497–521, 2013
- Canaud, B. Kooman, J. Selby, N. M. Taal, M. Francis, S. Kopperschmidt, P. Maierhofer, A. Kotanko, P. Titze, J. Sodium and water handling during hemodialysis: new pathophysiologic insights and management approaches for

improving outcomes in end-stage kidney disease. *Kidney Int*, **95**, 296–309, 2019.

- Cao, X. Yang, F. Y. Xin, Z. Xie, R. R. Yang, J. K. The ACE2/Ang-(1–7)/Mas axis can inhibit hepatic insulin resistance. *Mol Cell Endocrinol*, **393**, 30–38, 2014.
- Cappuccio, F. P. Strazzullo, P. Farinaro, E. Trevisan, M. Uric Acid Metabolism and Tubular Sodium Handling. *JAMA*, **21**, 354–359, 1993.
- Carey, R. M. Blood pressure and the renal actions of AT2 receptors. *Curr Hypertens Rep*, **19**, 21–24, 2017.
- Caron, A. Lee, S. Elmquist, K. J. Gautron, L. Leptin and brain–adipose crosstalks. *Nat Rev Neurosci*, **19**, 153–165, 2018.
- Castro, C. M. Cruzado, M. C. Miatello, R. M. Risler, N. R. Proteoglycan production by vascular smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive rats. *Hypertension*, **34**, 893–896, 1999.
- Chan, D. C. Barrett, P. H. Watts, G. F. Lipoprotein kinetics in the metabolic syndrome: pathophysiological and therapeutic lessons from stable isotope studies. *Clin Biochem Rev*, **25**, 31–48, 2004.
- Chandra, A. Neeland, I. J. Berry, J. D. Ayers, C. R. Rohatgi, A. Das, S. R. Khera, A. McGuire, D. K. de Lemos, J. A. Turer, A. T. The relationship of body mass and fat distribution with incident hypertension: observations from the Dallas Heart Study. *J Am Coll Cardiol*, **64**, 997–1002, 2014.
- Chen, D. & Coffman, T. M. AT1 Angiotensin receptors-vascular and renal epithelial pathways for blood pressure regulation. *Curr Opin Pharmacol*, **21**, 122–126, 2015.
- Chughtai, H. L. Morgan, T. M. Rocco, M. Stacey, B. Brinkley, T. E. Ding, J. Nicklas,
 B. Hamilton, C. Hundley, W. G. Renal sinus fat and poor blood pressure control in middle-aged and elderly individuals at risk for cardiovascular events. *Hypertension*, **56**, 901–906, 2010.

- Chusyd, D. E. Wang, D. Huffman, D. M. Nagy, T. R. Relationships between Rodent White Adipose Fat Pads and Human White Adipose Fat Depots. *Front Nutr*, **3**, 10–22, 2016.
- Cole, N. I. Suckling, R. J. Desilva, V. He, F. J. Macgregor, G. A. Swift, P. A. Serum sodium concentration and the progression of established chronic kidney disease. *J Nephrol*, **32**, 259–264, 2019.
- Conde, W. L. & Monteiro, C. A. Nutrition transition and double burden of undernutrition and excess of weight in Brazil. *Am J Clin Nutr,* **100**, 1617s–1622s, 2014.
- Costa, R. M. Neves, K. B. Tostes, R. C. Lobato, N. S. Perivascular adipose tissue as a relevant fat depot for cardiovascular risk in obesity. *Front Physiol*, **9**, 253–270, 2018.
- Deger, E. Celik, A. Dheir, H. Turunc, V. Yardimci, A. Torun, M. Cihangiroglu, M. Rejection evaluation after renal transplantation using MR diffusion tensor imaging. *Acta Radiol*, **59**, 876–883, 2018.
- Danese, A. & Tan, M. Childhood maltreatment and obesity: systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry*, **19**, 544–554, 2014.
- DeMarco, V. G. Johnson, M. S. Whaley-Connell, A. T. Sowers, J. R. Cytokine abnormalities in the etiology of the cardiometabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep*, **12**, 93–98, 2010.
- De Pergola, G. Campobasso, N. Nardecchia, A. Triggiani, V. Caccavo, D. Gesualdo,
 L. Silvestris, F. Manno, C. Para- and perirenal ultrasonographic fat thickness is associated with 24-hours mean diastolic blood pressure levels in overweight and obese subjects. *BMC Cardiovasc Disord*, **15**, 101–106, 2015
- Dias, J. Ferrão, F. M. Axelband, F. Carmona, A. K. Lara, L. S. Vieyra, A. ANG-(3-4) inhibits renal Na⁺-ATPase in hypertensive rats through a mechanism that involves dissociation of ANG II receptors, heterodimers, and PKA. *Am J Physiol Renal Physiol*, **306**, F855–F863, 2014.

- Dias, J. Axelband, F. Lara, L. S. Muzi-Filho, H. Vieyra, A. Is angiotensin-(3-4) (Val-Tyr), the shortest angiotensin II-derived peptide, opening new vistas on the renin-angiotensin system? *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, **18**, 1470320316689338, 2017.
- Dickinson, H. Moss, T. J. Gatford, K. L. Moritz, K. M. Akison, L. Fullston, T. Hryciw, D. H. Maloney, C. A. Morris, M. J. Wooldridge, A. L. Schjenken, J. E. Robertson, S. A. Waddell, B. J. Mark, P. J. Wyrwoll, C. S. Ellery, S. J. Thornburg, K. L. Muhlhausler, B. S. Morrison, J. L. A review of fundamental principles for animal models of DOHaD research: an Australian perspective. *J Dev Orig Health Dis*, **7**, 449–472, 2016.
- Dietz, W.H. Climate change and malnutrition: we need to act now. *J Clin Invest*, **130**, 556–558, 2020.
- Dobbs, R. Sawers, C. Thompson, F. Manyika, J. Woetzel, J.R. Child, P. McKenna, S. Spatharou, A. Overcoming Obesity: An Initial Economic Analysis. McKinsey Global Institute, 2014
- Du, Z. Ferguson, W. Wang, T. Role of PKC and calcium in modulation of effects of angiotensin II on sodium transport in proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*, **284**, F688–F692, 2003.
- Edwards, A. & Crambert, G. Versatility of NaCl transport mechanisms in the cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol*, **313**, F1254–F1263, 2017.
- Ellulu, M. S. Patimah, I. Khaza'ai, H. Rahmat, A. Abed, Y. Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. *Arch Med Sci*, **13**, 851–863, 2017.
- Fantin, F. Giani, A. Zoico, E. Rossi, A. P. Mazzali, G. Zamboni, M. Weight loss and hypertension in obese subjects. *Nutrients*, **11**, 1667–1690, 2019.
- Ferrão, F. M. Lara, L. S. Axelband, F. Dias, J. Carmona, A. K. Reis, R. I. Costa-Neto,C. M. Vieyra, A. Lowe, J. Exposure of luminal membranes of LLC-PK1 cells toANG II induces dimerization of AT1/AT2 receptors to activate SERCA and to

promote Ca2+ mobilization. *Am J Physiol Renal Physiol*, **302**, F875–F883, 2012.

- Fitzpatrick, D. F. Welch, L. T. Landon, E. J. Characterization of plasma membrane proteins in mammalian kidney. II. The binding of organic mercurials to rat kidney plasma membrane proteins in vivo. *J Biol Chem*, **244**, 3570–3574, 1969.
- Fitzsimons, J.T. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev*, **78**, 583–686, 1998.
- Fitzsimons, J. T. & Wirth, J. B. The renin-angiotensin system and sodium appetite. *J. Physiol*, **274**, 63–80, 1978.
- Fluharty, S.J. & Epstein, A.N. Sodium appetite elicited by intracerebroventricular infusion of angiotensin II in the rat: II. Synergistic interaction with systemic mineralocorticoids. *Behav Neurosci*, **97**, 746–758, 1983.
- Forny-Germano, L. De Felice, F. G. Vieira, M. The role of leptin and adiponectin in obesity-associated cognitive decline and Alzheimer's disease. *Front Neurosci*, **12**, 1027, 2019.
- Francischetti, E. A. & Genelhu, V. A. Obesity-hypertension: an ongoing pandemic. *Int J Clin Pract,* **61**, 269–280, 2007.
- Friedewald, W. T. Levy, R. I. Fredrickson, D. S. Estimation of the concentration of lowdensity lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*, **18**, 499–502, 1972.
- Fuster, J. J. & Walsh, K. The good, the bad, and the ugly of interleukin-6 signaling. *EMBO J*, **33**, 1425–1427, 2014.
- Garbarino, J. & Sturley, S.L. Saturated with fat: new perspectives on lipotoxicity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **12**, 110–116, 2009.
- Gasparini, S. Melo, M.R. Nascimento, P.A. Andrade-Franze, G.M.F. Antunes-Rodrigues, J. Yosten, G.L.C. Menani, J.V. Samson, W.K. and Colombari, E.

Interaction of central angiotensin II and aldosterone on sodium intake and blood pressure. *Brain Res*, **1720**, 146299, 2019.

- Gildea, J. J. Wang, X. Shah, N. Tran, H. Spinosa, M. Van Sciver, R. Sasaki, M. Yatabe, J. Carey, R. M. Jose, P. A. Felder, R. A. Dopamine and angiotensin type 2 receptors cooperatively inhibit sodium transport in human renal proximal tubule cells. *Hypertension*, **60**, 396–403, 2012.
- Granger, J. P. An emerging role for inflammatory cytokines in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **290**, H923–H924, 2006.
- Grillo, A. Salvi, L. Coruzzi, P. Salvi, P. Parati, G. Sodium intake and hypertension. *Nutrients*, **11**, 1970–1986, 2019.
- Guyton, A. C. Coleman, T. G. Cowley, A. V. Jr. Scheel, K. W. Manning, R. D. Jr. Norman, R. A. Jr. Arterial pressure regulation. Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension. *Am J Med*, **52**, 584–594, 1972.
- Hall, J. E. Carmo, J. M. d. Silva, A. A. d. Wang, Z. Hall, M. E. Obesity, kidney dysfunction and hypertension: mechanistic links. *Nature Reviews Nephrology*, **15**, 367–385, 2019.
- Hall, J. E. do Carmo, J. M. da Silva, A. A. Wang, Z. & Hall, M. E. Obesity-induced hypertension: interaction of neurohumoral and renal mechanisms. *Circ Res*, **116**, 991–1006, 2015.
- Hall, M. E. Clark, D. Jones, D. W. Fat and cardiometabolic risk: Location, location, location. *J Clin Hypertens*, **21**, 963–965, 2019.
- Hammond, R.A. & Levine, R. The economic impact of obesity in the United States. *Diabetes Metab Syndr Obes*, **3**, 285–295, 2010.
- Haneder, S. Juras, V. Michaely, H. J. Deligianni, X. Bieri, O. Schoenberg, S. O. Trattnig, S. Zbyn, S. In vivo sodium (₂₃Na) imaging of the human kidneys at 7 T: preliminary results. *Eur Radiol*, **24**, 494–501, 2014.

- Harwani, S. C. Macrophages under pressure: the role of macrophage polarization in hypertension. *Transl Res*, **191**, 45–63, 2018.
- He, F. J. Li, J. Macgregor, G. A. Effect of longer-term modest salt reduction on blood pressure, *Cochrane Database Syst Rev*, **30**, Cd004937, 2013.
- Haynes, M.P. Sinha, D. Russell, K.S. Collinge, M. Fulton, D. Morales-Ruiz, M. Sessa,
 W.C. and Bender, J.R. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res*, 87, 677–682, 2000.
- Hill, J. O. Wyatt, H. R. Peters, J. C. Energy balance and obesity. *Circulation*, **126**, 126–132, 2012.
- Hoffman, D. J. Upper limits in developing countries: warning against too much in lands of too little. *J Am Coll Nutr,* **23**, 610s–615s, 2004.
- Hruby, A. & Hu, F. B. The Epidemiology of obesity: A big picture. Pharmacoeconomics, **33**, 673–689, 2015.
- Ishimoto, T. Lanaspa, M. A. Le, M.T. Garcia, G. E. Diggle, C. P. Maclean, P. S. Jackman, M. R. Asipu, A. Roncal-Jimenez, C. A. Kosugi, T. Rivard, C. J. Maruyama, S. Rodriguez-Iturbe, B. Sánchez-Lozada, L. G. Bonthron, D. T. Sautin, Y. Y. Johnson, R. J. Opposing effects of fructokinase C and A isoforms on fructose-induced metabolic syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, **109**, 4320–4325, 2012.
- de Jairala, W. Vieyra, A. MacLaughlin, M. Influence of ethacrynic acid and ouabain on the oxygen consumption and potassium and sodium content of the kidney external medulla of the dog. *Biochim Biophys Acta*, **279**, 320–330, 1972.
- Kang, J.H. Jeong, B. G. Cho, Y. G. Hye Ryoung Song, H. R. Kim, K. A. Socioeconomic Costs of Overweight and Obesity in Korean Adults. *Korean Med Sci*, **26**, 1533–1540, 2011.
- Kawasaki, T. Seki, E. Osajima, K. Yoshida, M. Asada, K. Matsui, T. Osajima, Y. Antihypertensive effect of valyl-tyrosine, a short chain peptide derived from

sardine muscle hydrolyzate, on mild hypertensive subjects. *J Hum Hypertens*, **14**, 519–523, 2000.

- Kemp, B. A. Howell, N. L. Gildea, J. J. Keller, S. R. Padia, S. H. Carey, R. M. AT(2) receptor activation induces natriuresis and lowers blood pressure. *Circ Res*, **115**, 388–399, 2014.
- Khan, A. Chenggang, Y. Hussain, J. Bano, S. Does energy consumption, financial development, and investment contribute to ecological footprints in BRI regions?. *Environ Sci Pollut Res Int*, **26**, 36952–36966, 2019.
- Kim, D. H. Kim, C. Ding, E. L. Townsend, M. K. Lipsitz, L. A. Adiponectin levels and the risk of hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Hypertension*, 62, 27–32, 2013.
- Kobori, H. Nangaku, M. Navar, L. G. Nishiyama, A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev*, **59**, 251–287, 2007.
- Kopf, M. Baumann, H. Freer, G. Freudenberg, M. Lamers, M. Kishimoto, T. Zinkernagel, R. Bluethmann, H. Köhler, G. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. Nature, **368**, 339–342, 1994.
- Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685, 1970.
- LaMarca, B. B. Bennett, W. A. Alexander, B. T. Cockrell, K. Granger, J. P. Hypertension produced by reductions in uterine perfusion in the pregnant rat: role of tumor necrosis factor-alpha. *Hypertension*, **46**, 1022–1025, 2005.
- Lanaspa, M. A. Kuwabaraa, M. Andres-Hernandoa, A. Lia, N. Cicerchia, C. Jensena,
 T. Orlickyb, D. J. Roncal-Jimeneza, C. A. Ishimotoa, T. Nakagawaa, T.
 Rodriguez-Iturbec, B. MacLeand, P. S. Johnsona, R. J. High salt intake causes
 leptin resistance and obesity in mice by stimulating endogenous fructose
 production and metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*, **115**, 3138–3143, 2018.

- Lara, L. S. Correa, J. S. Lavelle, A. B. Lopes, A. G. Caruso-Neves, C. The angiotensin receptor type 1-Gq protein-phosphatidyl inositol phospholipase Cbeta-protein kinase C pathway is involved in activation of proximal tubule Na⁺-ATPase activity by angiotensin(1–7) in pig kidneys. *Exp Physiol*, **93**, 639–647, 2008.
- Lee, D. L. Sturgis, L. C. Labazi, H. Osborne, J. B. Jr. Fleming, C. Pollock, J. S. Manhiani, M. Imig, J. D. Brands, M. W. Angiotensin II hypertension is attenuated in interleukin-6 knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **290**, 935–940, 2006.
- Light, K. E. Kane, C. J. Pierce, D. R. Jenkins, D. Ge, Y. Brown, G. Yang, H. Nyamweya, N. Intragastric intubation: important aspects of the model for administration of ethanol to rat pups during the postnatal period. *Alcohol Clin Exp Res*, **22**, 1600–1606, 1998.
- Lobstein, T. Baur, L. Uauy, R. Obesity in children and young people: a crisis in public health. *Obes Rev*, **5**, 4–85, 2004.
- Lowry, O. H. Rosebrough, N. J. Farr, A. L. Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**, 265–275, 1951.
- MacLean, P. S. Higgins, J. A. Giles, E. D. Sherk, V. D. Jackman, M. R. The role for adipose tissue in weight regain after weight loss. *Obes Rev*, **16** Suppl, 145–154, 2015.
- Maenhaut, N. Van De Voorde, J. Regulation of vascular tone by adipocytes. *BMC Med*, **9**, 25–37, 2011.
- Malik, V.S. Willett, W.C. Hu, F.B. Global obesity: trends, risk factors and policy implications. *Nat Rev Endocrinol*, **9**, 13–27, 2013.
- Mancuso P. The role of adipokines in chronic inflammation. *Immunotargets Ther*, **5**, 47–56, 2016.
- Marsigliante, S. Muscella, A. Elia, M. G. Greco, S. Storelli, C. Angiotensin II AT₁ receptor stimulates Na⁺–K⁺ ATPase activity through a pathway involving PKCζ in rat thyroid cells. *J Physiol*, **546**, 461–470, 2003.

- Matsufuji, H. Matsui, T. Ohshige, S. Kawasaki, T. Osajima, K. Osajima, Y. Antihypertensive effects of angiotensin fragments in SHR. *Biosci Biotechnol Biochem*, **59**, 1398–1401, 1995.
- Matsui, T. Imamura, M. Oka, H. Osajima, K. Kimoto, K. Kawasaki, T. Matsumoto, K. Tissue distribution of antihypertensive dipeptide, Val-Tyr, after its single oral administration to spontaneously hypertensive rats. *J Pept Sci*, **10**, 535–545, 2004.
- Mauer, J. Chaurasia, B. Goldau, J. Vogt, M. C. Ruud, J. Nguyen, K. D. Theurich, S. Hausen, A. C. Schmitz, J. Brönneke, H. S. Estevez, E. Allen, T. L. Mesaros, A. Partridge, L. Febbraio, M. A. Chawla, A. Wunderlich, F. T. Brüning, J. C. Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. *Nat Immunol*, **15**, 423–430, 2014.
- Merjan, A.J. kanashiro, C.A. Krieger, J. E. Han, S. W. Paiva, A. C. M. Ligand-induced endocytosis and nuclear localization of angiotensin II receptors expressed in CHO cells. *Braz J Med Biol Res*, **34**, 1175–1183, 2001.
- de Morais, R. F. Franco, A. A. Sautet, P. Loffreda, D. Coverage-dependent thermodynamic analysis of the formation of water and hydrogen peroxide on a platinum model catalyst. *Phys Chem Chem Phys*, **17**, 11392–11400, 2015.
- Mill, J. G. Malta, D. C. Machado, I. E. Patel, A. Pereira, C. A. Jaime, P. C. Szwarcwald, C. L. Rosenfeld, L. G. Estimation of salt intake in the Brazilian population: results from the 2013 National Health Survey. *Rev bras epidemiol*, 22, E190009, 2019.
- Moon, C. H. Furlan, A. Kim, J. H. Zhao, T. Shapiro, R. Bae, K. T. Quantitative sodium MR imaging of native versus transplanted kidneys using a dual-tuned proton/sodium (1H/ 23Na) coil: initial experience. *Eur Radiol*, **24**, 1320–1326, 2014.

- Mottillo, S. Filion, K. B. Genest, J. Joseph, L. Pilote, L. Poirier, P. Rinfret, S. Schiffrin,
 E. L. Eisenberg, M. J. The metabolic syndrome and cardiovascular risk a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*, 56, 1113–1132, 2010.
- Mouton, A. J. Li, X. Hall, M. E. Hall, J. E. Obesity, hypertension, and cardiac dysfunction: novel roles of immunometabolism in macrophage activation and inflammation. *Circ Res*, **126**, 789–806, 2020.
- Must, A. Jacques, P. F. Dallal, G. E. Bajema, C. J. Dietz, W. H. Long-Term Morbidity and Mortality of Overweight Adolescents. *N Engl J Med*, **5**, 1350–1354, 2010.
- Nadeau, K. J. Maahs, D. M. Daniels, S. R. Eckel, R. H. Childhood obesity and cardiovascular disease: links and prevention strategies. *Nature reviews*, 8, 513–525, 2011.
- Navar, L. G. Prieto, M. C. Satou, R. Kobori, H. Intrarenal angiotensin II and its contribution to the genesis of chronic hypertension. *Curr Opin Pharmacol*, **11**, 180–186, 2011.
- NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. *Lancet*, **390**, 2627–2642, 2017.
- Nijst, P. Verbrugge, F. H. Grieten, L. Dupont, M. Steels, P. Tang, W. H. W. Mullens,
 W. The pathophysiological role of interstitial sodium in heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 65, 378–388, 2015.
- Ohinata, K. Fujiwara, Y. Fukumoto, S. Iwai, M. Horiuchi, M. Yoshikawa, M. Angiotensin II and III suppress food intake via angiotensin AT(2) receptor and prostaglandin EP(4) receptor in mice. *FEBS Lett*, **582**, 773–777, 2008.
- Ohsawa, M. Tamura, K. Wakui, H. Maeda, A. Dejima, T. Kanaoka, T. Azushima, K. Uneda, K. Tsurumi-Ikeya, Y. Kobayashi, R. Matsuda, M. Uchida, S. Toya, Y. Kobori, H. Nishiyama, A. Yamashita, A. Ishikawa, Y. Umemura, S. Deletion of the angiotensin II type 1 receptor-associated protein enhances renal sodium

reabsorption and exacerbates angiotensin II-mediated hypertension. *Kidney Int*, **86**, 570–581, 2014.

- Olde Engberink, R. H.G. Rorije, N. M. G. Van Der Heide, J. J. H. Van Den Born, B. J. Vogt, L. Role of the vascular wall in sodium homeostasis and salt sensitivity. *J Am Soc Nephrol*, **26**, 777–783, 2014.
- de Oliveira, M. L. Santos, L. M. P. da Silva, E. N. Direct healthcare cost of obesity in brazil: an application of the cost-of-illness method from the perspective of the public health system in 2011. *PLoS One*, **10**, e0121160, 2015.
- Pacheco, S.E. Catastrophic effects of climate change on children's health start before birth. *J Clin Invest*, **130**, 562–564, 2020.
- Parekh, N. & Zou, A. P. Role of prostaglandins in renal medullary circulation: response to different vasoconstrictors. *Am J Physiol*, **271**, 653–658, 1996.
- Park, M. H. Falconer, C. Viner, R. M. Kinra, S. The impact of childhood obesity on morbidity and mortality in adulthood: a systematic review. *Obes Rev*, **13**, 985–1000, 2012.
- Park, S. Williams, K.W. Liu, C. Sohn, J.W. A neural basis for tonic suppression of sodium appetite. *Nat Neurosci*, 10.1038/s41593-019-0573-2, 2020
- Pham, D. V. Park, P. H. Recent insights on modulation of inflammasomes by adipokines: a critical event for the pathogenesis of obesity and metabolism-associated diseases. *Arch Pharm Res*, **43**, 997–1016, 2020.
- Polychronopoulou, E. Braconnier, P. Burnier, M. New insights on the role of sodium in the physiological regulation of blood pressure and development of hypertension. *Front Cardiovasc Med*, **6**, 136–145, 2019.
- Pontes, R. B. Girardi, A. C. Nishi, E. E. Campos, R. R. Bergamaschi, C. T. Crosstalk between the renal sympathetic nerve and intrarenal angiotensin II modulates proximal tubular sodium reabsorption. *Exp Physiol*, **100**, 502–506, 2015.

- Popkin, B. M. Richards, M. K. Montiero, C. A. Stunting is associated with overweight in children of four nations that are undergoing the nutrition transition. *J Nutr*, **126**, 3009–3016, 1996.
- Porro, S. Genchi, V. A. Cignarelli, A. Natalicchio, A. Laviola, L. Giorgino, F. Perrini, S. Dysmetabolic adipose tissue in obesity: morphological and functional characteristics of adipose stem cells and mature adipocytes in healthy and unhealthy obese subjects. *J Endocrinol Invest*, 10.1007/s40618-020-01446-8, 2020.
- Quatrale, R.P. & Laden, K. Solute and water secretion by the eccrine sweat glands of the rat. *J Invest Dermatol*, **51**, 502–504, 1968.
- Quek, Y. H. Tam, W. W. S. Zhang, M. W. B. Ho, R. C. M. Exploring the association between childhood and adolescent obesity and depression: a metaanalysis. *Obes Rev,* **18**, 742–754, 2017.
- Quinn, R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition*, **21**, 775–777, 2005.
- Rayner, D.V. & Trayhurn, P. Regulation of leptin production: sympathetic nervous system interactions. *J Mol Med (Berl*), **79**, 8–20, 2001.
- Reeves, P. G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr*, **127**, 838s–841s, 1997.
- Resnick, L. M. Militianu, D. Cunnings, A. J. Pipe, J. G. Evelhoch, J. L. Soulen, R. L. Direct magnetic resonance determination of aortic distensibility in essential hypertension: relation to age, abdominal visceral fat, and in situ intracellular free magnesium. *Hypertension*, **30**, 654–659, 1997.
- Reynertson, R. H. Parmley, R. T. Roden, L. Oparil, S. Proteoglycans and hypertension. I. A biochemical and ultrastructural study of aorta glycosaminoglycans in spontaneously hypertensive rats. *Coll Relat Res*, 6, 77–101, 1986.

- Ricci, M. A. Scavizzi, M. Ministrini, S. De Vuono, S. Pucci, G. Lupattelli, G. Morbid obesity and hypertension: The role of perirenal fat. *J Clin Hypertens* (*Greenwich*), **20**, 1430–1437, 2018.
- Su, X. & Chang, D. Role of adiposopathy and physical activity in cardio-metabolic disorder diseases. *Clin Chim Acta*, **511**, 243–247, 2020.
- Dobbs, R. J. M. & Woetzel, J. Overcoming obesity: An initial economic analysis. Disponível em: https://www.mckinsey.com/~/media/McKinsey/Business%20Functions/Econo mic%20Studies%20TEMP/Our%20Insights/How%20the%20world%20could% 20better%20fight%20obesity/MGI_Overcoming_obesity_Full_report.ashx. Acessado em 08/03/2020.
- Rizzo, M. & Berneis, K. An update on the role of the quality of LDL in cardiovascular risk: the contribution of the universities of Palermo and Zurich. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*, 2, 85–88, 2007.
- Roccabianca, S. Bellini, C. Humphrey, J. D. Computational modelling suggests good, bad and ugly roles of glycosaminoglycans in arterial wall mechanics and mechanobiology. *J R Soc Interface*, **11**, 20140397, 2014.
- Romanova, I. V. Ramos, E. J. Xu, Y. Quinn, R. Chen, C. George, Z. M. Inui, A. Das,
 U. Meguid, M. M. Neurobiologic changes in the hypothalamus associated with weight loss after gastric bypass. *J Am Coll Surg*, **199**, 887–895, 2004.
- Saito, Y. Wanezaki, K. Kawato, A. Imayasu, S. Antihypertensive effects of peptide in sake and its by-products on spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, **58**, 812–816, 1994.
- Sakai, R.R. Chow, S.Y. Epstein, A.N. Peripheral angiotensin II is not the cause of sodium appetite in the rat. *Appetite*, **15**, 161–170, 1990.
- Sampson, A. K. Moritz, K. M. Jones, E. S. Flower, R. L. Widdop, R. E. Denton, K. M. Enhanced angiotensin II type 2 receptor mechanisms mediate decreases in

arterial pressure attributable to chronic low-dose angiotensin II in female rats. *Hypertension*, **52**, 666–671, 2008.

- Santos, L. M. P. & Oliveira, M. L. D. Estimativa dos custos da obesidade para o Sistema Único de Saúde do Brasil. Disponível em: https://repositorio.unb.br/handle/10482/13323. Acessado em 08/03/2013.
- Satou, R. Shao, W. Navar, L. G. Role of stimulated intrarenal angiotensinogen in hypertension. *Ther Adv Cardiovasc Dis*, **9**, 181–190, 2015.
- Sawaya, A. L. Dallal, G. Solymos, G. de Sousa, M. H. Ventura, M. L. Roberts, S. B. Sigulem, D. M. Obesity and malnutrition in a Shantytown population in the city of Sao Paulo, Brazil. *Obes Res*, **3** Suppl, 2107s–2115s, 1995.
- Vigitel. Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel). Disponível em: https://www.saude.gov.br/noticias/911-indicadores-de-saude/41423vigilancia-de-fatores-de-risco-e-protecao-para-doencas-cronicas-porinquerito-telefonico-vigitel-2. Acessado em 08/03/2020
- Sichieri, R. do Nascimento, R. Coutinho, W. The burden of hospitalization due to overweight and obesity in Brazil. *Cad. Saúde Pública*, **23**, 1721–1727, 2007.
- Silva, P. A. Monnerat-Cahli, G. Pereira-Acácio, A. Luzardo, R. Sampaio, L. S. Luna-Leite, M. A. Lara, L. S. Einicker-Lamas, M. Panizzutti, R. Madeira, C. Vieira-Filho, L. D. Castro-Chaves, C. Ribeiro, V. S. Paixão, A. D. O. Medei, E. Vieyra, A. Mechanisms Involving Ang II and MAPK/ERK1/2 Signaling Pathways Underlie Cardiac and Renal Alterations during Chronic Undernutrition. *PLoS One*, **9**, e100410, 2014a.
- Silva, P. A. Muzi-Filho, H. Pereira-Acácio, A. Dias, J. Martins, J. F. Landim-Vieira, M. Verdoorn, K. S. Lara, L. S. Vieira-Filho, L. D. Cabral, E. V. Paixão, A. D. Vieyra, A. Altered signaling pathways linked to angiotensin II underpin the upregulation of renal Na⁺-ATPase in chronically undernourished rats. *Biochim Biophys Acta*, 1842, 2357–2366, 2014b.
Singer, J. The human ramifications. Acad Emerg Med, **13**, 1340–1341, 2006.

- Singh, A.S. Mulder, C. Twisk, J.W. van Mechelen, W. and Chinapaw, M.J. Tracking of childhood overweight into adulthood: a systematic review of the literature. *Obes Rev*, **9**, 474–488, 2008.
- Schroeder, D. G. Martorell, R. Flores, R. Infant and child growth and fatness and fat distribution in Guatemalan adults. *Am J Epidemiol*, **149**, 177–185, 1999.
- Sichieril, R. Nascimentol, S. D. Coutinholl, W. The burden of hospitalization due to overweight and obesity in Brazil. *Cad. Saúde Pública*, **23**. 1721–1727 2020.
- Silva, P. A. Muzi-Filho, H. Pereira-Acacio, A. Dias, J. Martins, J. F. Landim-Vieira, M. Verdoorn, K. S. Lara, L. S. Vieira-Filho, L. D. Cabral, E. V. Paixao, A. D. Vieyra, A. Altered signaling pathways linked to angiotensin II underpin the upregulation of renal Na(+)-ATPase in chronically undernourished rats. *Biochim Biophys Acta*, 1842, 2357–2366, 2014b.
- So, T. & Thorens, B. Uric acid transport and disease. *J Clin Invest*, **120**, 1791–1799, 2010.
- Somero, G. N. Protons, osmolytes, and fitness of internal milieu for protein function. *Am J Physiol*, **251**, 197–213, 1986.
- Strazzullo, P. Barbab, G. Cappuccioc, F. P. Sianib, A. Trevisand, M. Farinaroe, E. Paganoa, E. Barbatoa, A. Iaconea, R. Galletti, F. Altered renal sodium handling in men with abdominal adiposity: a link to hypertension. *J Hypertens*, **19**, 2157–2164, 2001.
- Swinburn, B.A. Kraak, V.I. Allender, S. Atkins, V.J. Baker, P.I. Bogard, J.R. Brinsden,
 H. Calvillo, A. De Schutter, O. Devarajan, R. Ezzati, M. Friel, S. Goenka, S.
 Hammond, R.A. Hastings, G. Hawkes, C. Herrero, M. Hovmand, P.S. Howden,
 M. Jaacks, L.M. Kapetanaki, A.B. Kasman, M. Kuhnlein, H.V. Kumanyika, S.K.
 Larijani, B. Lobstein, T. Long, M.W. Matsudo, V.K.R. Mills, S.D.H. Morgan, G.
 Morshed, A. Nece, P.M. Pan, A. Patterson, D.W. Sacks, G. Shekar, M.
 Simmons, G.L. Smit, W. Tootee, A. Vandevijvere, S. Waterlander, W.E.

Wolfenden, L. and Dietz, W.H. The Global Syndemic of Obesity, Undernutrition, and Climate Change: The Lancet Commission report. *Lancet*, **393**, 791–846, 2019.

- Tanaka, M. Matsui, T. Ushida, Y. Matsumoto, K. Vasodilating effect of di-peptides in thoracic aortas from spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, **70**, 2292–2295, 2006.
- Taussky, H. H. & Shorr, E. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J Biol Chem*, **202**, 675–685, 1953.
- Titze, J. Krause, H. Hecht, H. Dietsch, P. Rittweger, J. Lang, R. Kirsch, K. A. Hilgers,
 K. F. Reduced osmotically inactive Na storage capacity and hypertension in the
 Dahl model. *Am J Physiol Renal Physiol*, **283**, F134–F141, 2002.
- Titze, J. Lang, R. Ilies, C. Schwind, K. H. Kirsch, K. A. Dietsch, P. Luft, F. C. Hilgers, K. F. Osmotically inactive skin Na+ storage in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 285, F1108–F1117, 2003.
- Titze, J. Luft, F. C. Bauer, K. Dietsch, P. Lang, R. Veelken, R. Wagner, H. Eckardt, K. Hilgers, K. F. Extrarenal Na⁺ balance, volume, and blood pressure homeostasis in intact and ovariectomized deoxycorticosterone-acetate salt rats. *Hypertension*, **47**, 1101–1107, 2006.
- Titze, J. & Luft, F. C. Speculations on salt and the genesis of arterial hypertension. *Kidney Int*, **91**, 1324–1335, 2017.
- Tremmel, M. Gerdtham, U. G. Nilsson, P. M. Saha, S. Economic Burden of Obesity: A Systematic Literature Review. Int J Environ Res Public Health, 14, 435–453, 2017.
- Vegt, E. Melis, M. Eek, A. de Visser, M. Brom, M. Oyen, W. J. G. Gotthardt, M. de Jong, M. Boerman, O. C. Renal uptake of different radiolabelled peptides is mediated by megalin: SPECT and biodistribution studies in megalin-deficient mice. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **38**, 623–632, 2011.

- Vieyra, A. Nachbin, L. de Dios-Abad, E. Goldfeld, M. Meyer-Fernandes, J. R. de Moraes, L. Comparison between calcium transport and adenosine triphosphatase activity in membrane vesicles derived from rabbit kidney proximal tubules. *J Biol Chem*, **261**, 4247–4255, 1986.
- Vieyra, A. Caruso-Neves, C. Meyer-Fernandes, J. R. ATP in equilibrium with 32Pi exchange catalyzed by plasma membrane Ca(2+)-ATPase from kidney proximal tubules. *J Biol Chem*, **266**, 10324–10330, 1991.
- Wang, Y. Beydoun, M. A. Liang, L. Caballero, B. Kumanyika, S. K. Will all Americans become overweight or obese? estimating the progression and cost of the US obesity epidemic. *Obesity (Silver Spring)*, **16**, 2323–2330, 2008.
- Weihe, P. Spielmann, J. Kielstein, H. Henning-Klusmann, J. Weihrauch-Blüher, S. Childhood Obesity and Cancer Risk in Adulthood. *Curr Obes Rep*, 9, 204–212, 2020.
- Weinberger, M. H. Is salt-sensitivity of blood pressure a reproducible phenomenoncommentary. *J Hypertens*, **14**, 1461–1462, 1996.
- Weisberg, S. P. McCann, D. Desai, M. Rosenbaum, M. Leibel, R. L. Ferrante Jr. A.
 W. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, **112**, 1796–1808, 2003.
- West-Eberhard, M. J. Nutrition, the visceral immune system, and the evolutionary origins of pathogenic obesity. *Proc Natl Acad Sci*, **116**, 723–731, 2019.
- Whittembury, G. & Proverbio, F. Two models of Na extrusion in cells from guinea pig kidney cortex slices. *Pflugers Arch*, **316**, 1–25, 1970.
- Wiig, H. Luft, F. C. Titze, J. M. The interstitium conducts extrarenal storage of sodium and represents a third compartment essential for extracellular volume and blood pressure homeostasis. *Acta Physiol (Oxf)*, **222**, e13006, 2018.
- Winkler, M. Schuchard, J. Stolting, I. Vogt, F.M. Barkhausen, J. Thorns, C. Bader, M. Raasch, W. The brain renin-angiotensin system plays a crucial role in

regulating body weight in diet-induced obesity in rats. *Br J Pharmacol*, **173**, 1602–1617, 2016.

- Xia, K. Ding, R. Yang, Y. Wu, B. Zhang, Q. Hu, D. [Association between serum leptin, adiponectin, visfatin, obesity and hypertension in female]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, **54**, 768–72, 2015.
- Xie, D. & Bollag, W. B. Obesity, hypertension and aldosterone: is leptin the link? *J Endocrinol*, **230**, F7–F11, 2016.
- Xu, H. Barnes, G. T. Yang, Q. Tan, G. Yang, D. Chou, C. J. Sole, J. Nichols, A. Ross, J. S. Tartaglia, L. A. Chen, H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*, **112**, 1821–1830, 2003.